

Die von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 produzierten Toxine und ihr Einfluss auf die Biologische Kontrolle des Bakterienbrandes der Sojabohne

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-
Universität Jena

von Diplom-Biologe Sascha Braun
geboren am 29.06.1976 in Erfurt

Gutachter:

1. Erika Kothe
2. Matthias Ullrich
3. Klaus Geider

Tag der öffentlichen Disputation: 19.06.2009

Inhalt

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Biologischer Pflanzenschutz – Vor- und Nachteile.....	1
1.2.	Wechselwirkungen zwischen Wirt, Pathogen und dem Biokontroll-organismus.....	4
1.3.	Antibiotika und ihre Rolle bei der Biologischen Kontrolle.....	8
1.4.	Biologische Kontrolle des Bakterienbrandes der Sojabohne.....	11
1.5.	Zielstellung.....	14
2.	Übersicht der Manuskripte.....	17
3.	Manuskripte.....	20
3.1.	Manuskript I.....	21
	Braun, S. D., B. Völksch, J. Nüske, and D. Spiteller	
	3-Methylarginine from <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 22d/93 suppresses the bacterial blight caused by its close relative <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> .	
3.2.	Manuskript II.....	44
	Braun S. D., J. Hofmann, A. Wensing, M. S. Ullrich, H. Weingart, B. Völksch, D. Spiteller	
	Identification of the biosynthetic gene cluster of 3-methylarginine, a toxin produced by <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 22d/93.	
3.3.	Manuskript III.....	72
	Braun, S. D., J. Hofmann, A. Wensing, H. Weingart, M. S. Ullrich, D. Spiteller, and B. Völksch	
	<i>In vitro</i> antibiosis by <i>Pseudomonas syringae</i> Pss22d, acting against the bacterial blight pathogen of soybean plants, does not influence <i>in planta</i> biocontrol.	
4.	Gesamtdiskussion.....	95
4.1.	3-Methylarginin, eine toxische Aminosäure.....	96
4.2.	3-Methylarginin-Biosynthesegencluster und regulatorische Funktionen.....	97
4.3.	Analyse der 3-Methylarginin-Biosynthese.....	102
4.4.	Heterologe Expression und Charakterisierung von <i>mrsA</i> und <i>mrsB</i>	103
4.5.	Rolle der von <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 22d/93 produzierten Toxine <i>in planta</i>	104
5.	Ausblick.....	109
6.	Zusammenfassung.....	111
7.	Summary.....	113
8.	Literatur.....	115
	Danksagung	
	Eigenständigkeitserklärung	
	Curriculum vitae	

1. Einleitung

Ebenso wie Menschen und Tiere werden auch Pflanzen von einem breiten Spektrum mikrobieller Pathogene befallen. Trotz stetig steigender Ausgaben für chemische Pflanzenschutzmittel ist der weltweite Ernteverlust durch phytopathogene Erreger mit ca. 14 % pro Jahr immens. Durch Krankheiten bei Transport und Lagerung gehen nochmals 6-12 % der Gesamternte verloren (Agrios, 2005). Trotz des weltweit intensiven Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln in der Agrarwirtschaft sind hohe ökonomische Verluste von mehr als 220 Milliarden US-Dollar zu verzeichnen. Hauptursache ist die zunehmende Globalisierung, bedingt durch Welthandel und Tourismus, wodurch Pflanzenpathogene sehr schnell in neue Regionen immigrieren und sich unter günstigen Umweltbedingungen sehr schnell verbreiten können. Beispielsweise verbreitete sich der Erreger des Feuerbrandes *Erwinia amylovora*, der ursprünglich aus den Gebieten Nordamerikas stammt, in den 1990er Jahren rasant in ganz Europa (Eastgate, 2008). Ein weiteres, nicht zu vernachlässigendes Problem stellt der großflächige Anbau von Monokulturen dar, in denen sich pflanzenassoziierte Erreger besonders schnell und effizient verbreiten können. Der daraus resultierende dauerhafte Einsatz von Pflanzenschutzmitteln führt wiederum dazu, dass phytopathogene Erreger in relativ kurzer Zeit Resistenzen erwerben (Baker *et al.*, 1997; McManus *et al.*, 2002) und diese auch auf humanpathogene Erreger übertragen werden können (Teuber, 1999; Teuber *et al.*, 1999; McManus *et al.*, 2002). Andere Gründe, den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln kritisch zu betrachten, sind die Persistenz vieler Wirkstoffe im Ökosystem (Angioni *et al.*, 2003) und die Toxizität vieler Abbauprodukte (Sinclair & Boxall, 2003). Das hierdurch wachsende öffentliche Interesse an den möglichen Nebenwirkungen mancher Pflanzenschutzmittel, veranlasste die Europäische Union, die Richtlinie 91/414/CEE, welche die Sicherheits- und Zulassungsbestimmungen von Pflanzenschutzmitteln reguliert, grundlegend zu überarbeiten. Der Änderung dieser Richtlinie 2002 folgten Verbote von 320 frei verkäuflichen Präparaten auf dem gesamten Europäischen Markt und gleichzeitig mussten 150 neu geprüft werden. Insgesamt sind über 60 % der bis dato zugelassenen Pflanzenschutzmittel nur noch eingeschränkt nutzbar, was die Frage nach Alternativen aufwarf und die Forschung im biologischen Pflanzenschutz in den vergangenen Jahren stark vorantrieb.

1.1. Biologischer Pflanzenschutz – Vor- und Nachteile

Eine vielversprechende Alternative zu konventionellen Pflanzenschutzmitteln stellt der Einsatz von Antagonisten dar, die pflanzenschädigende Organismen unterdrücken können.

Dieser Ansatz wird in der Wissenschaft als Biologische Kontrolle und der verantwortliche Antagonist als Biokontrollorganismus (BKO) bezeichnet (Wilson, 1997a).

Im Folgenden sollen antagonistisch wirkende Mikroorganismen betrachtet und ihre wesentlichen Vorteile gegenüber konventionellen Pflanzenschutzmitteln aufgezeigt werden. Vor allem das Vermögen mikrobieller BKO, über einen längeren Zeitraum stabile Populationen am behandelten Pflanzenbestand zu bilden, ist gegenüber den konventionell eingesetzten Pflanzenschutzmitteln von Vorteil, da ständige Nachbehandlungen entfallen und somit Kosten gesenkt werden (Montesinos, 2003). Dazu kommt, dass der direkte Einfluss der BKO auf andere heimische Mikroorganismen oder höhere Lebewesen im Vergleich zu breit wirkenden, chemischen Substanzen sehr gering ist (Emmert & Handelsman, 1999). Der größte Vorteil eingesetzter BKO ist aber ihre Flexibilität, da sie als lebende Organismen auf das Pathogen und ihre direkte Umwelt reagieren können. Das minimiert das Risiko von Resistenzbildung beim Pathogen und trägt erheblich zur Effizienz bei (Handelsman & Stabb, 1996; Emmert & Handelsman, 1999). In der klassischen Biokontrollforschung werden drei Systeme unterschieden: Biokontrolle in der Rhizosphäre (rhizospheral biocontrol), Biokontrolle in der Phyllosphäre (phyllospherical biocontrol) und die Biokontrolle nach der Ernte (post-harvest disease control). Die Biologische Kontrolle bei der Lagerung von Nahrungsmitteln ist vergleichsweise einfach, da die Möglichkeit besteht, die klimatischen Bedingungen dem BKO optimal anzupassen, was dem Kontrollorganismus einen Vorteil gegenüber dem Pathogen verschafft (Janisiewicz & Korsten, 2002). Die Biologische Kontrolle in der Rhizosphäre unterliegt variablen Bedingungen, wobei hier die Verfügbarkeit von Nährstoffen von besonderer Bedeutung ist. Einerseits führt eine stabile Nährstoffzufuhr zur Erhöhung der Mikrobendichte und -diversität, so dass BKO mit einer Vielzahl von Mikroorganismen konkurrieren müssen. Andererseits ist bekannt, dass Wirtspflanzen selbst durch spezielle Nährstoffe BKO unterstützen und deren Fitness stark erhöhen können (Weller *et al.*, 2002). Die Phyllosphäre hingegen ist ein Habitat der Extreme. Neben geringer Nährstoffverfügbarkeit sind die Mikroorganismen starken Schwankungen von Temperatur, Feuchtigkeit und UV-Strahlung ausgesetzt. Die Isolierung möglicher BKO aus der Phyllosphäre ist deshalb ungleich schwieriger. Dennoch wurden in den letzten Jahren einige BKO identifiziert, die diesen unwirtlichen Bedingungen standhalten und als nichtpathogene Epiphyten stabile Population bilden (Wilson, 1997b; Braun-Kiewnick *et al.*, 2000; Völksch & May, 2001; Ji & Wilson, 2003; Stromberg *et al.*, 2004).

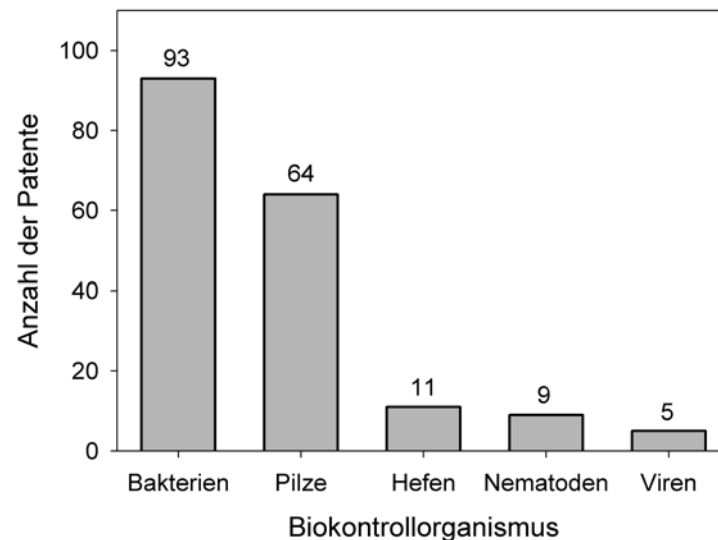


Abb. 1: **Patente verschiedener Biokontrollorganismen**
Anzahl die weltweit eingereichten Patente für Biokontrollorganismen nach Montesinos (2003).

Trotz umfangreicher Forschung auf dem Gebiet der Biologischen Kontrolle durch Mikroorganismen in den letzten Jahren gibt es nur wenige registrierte Patente (Abb. 1), wovon wiederum nur ein geringer Anteil kommerziell eingesetzt wird (Agrios, 2005). Es stellt sich die Frage nach der Ursache dieser zögerlichen Nutzung. Der schon erwähnte Vorteil, die Flexibilität des BKO, stellt gleichzeitig den größten Nachteil dar. In vielen Fällen besteht kein direkter Zusammenhang zwischen einer sehr guten *in vitro* Hemmung und der *in planta* Effizienz gegen ein Pflanzenpathogen. Dieses häufig beobachtete Phänomen erschwert die Identifizierung potentieller BKO. Auch im Labor durchgeführte Experimente *in planta* garantieren nicht, dass die nachgewiesene Effizienz eines potentiellen BKO sich auch unter Gewächshaus- oder sogar Feldbedingungen wiederfindet (Shoda, 2000; Montesinos *et al.*, 2002), was vor allem durch die unvorhersehbaren, wechselnden Bedingungen in natürlicher Umgebung (Klima, benachbarte Organismen, usw.) bedingt ist. Das wird durch einen Vergleich der Resultate verschiedener Feldapplikationen deutlich (Thomashow, 1996). Der Erfolg einer Biologischen Kontrolle hängt demnach von den komplexen Zusammenhängen zwischen Wirtspflanze, Pathogen, BKO und deren Umwelt ab, wobei die meisten Wechselwirkungen bisher nur unzureichend verstanden sind. Somit stellt die Forschung über die Vielschichtigkeit dieser Interaktionen eine Schlüsselposition für die erfolgreiche Einführung von Systemen zur Biologischen Kontrolle dar (Handelsman & Stabb, 1996; Duffy *et al.*, 2003; Montesinos, 2003).

1.2. Wechselwirkungen zwischen Wirt, Pathogen und dem Biokontrollorganismus

Im Zusammenhang mit der Biologischen Kontrolle wurde die Beziehung zwischen Wirtspflanze und Pathogen in den letzten Jahrzehnten am intensivsten untersucht. Seit Burill (1878) erkannte, dass auch bakterielle Mikroorganismen Pflanzenkrankheiten verursachen, wurden eine Vielzahl erkrankter Pflanzen detailliert auf bakterielle Erreger hin untersucht (Montesinos, 2000). Bakterielle Phytopathogene durchlaufen in aller Regel eine epiphytische Phase, in der sie sich vermehren und eine stabile Population auf der Pflanzenoberfläche bilden. Eine Bedrohung für den Wirt entsteht durch Eindringen über

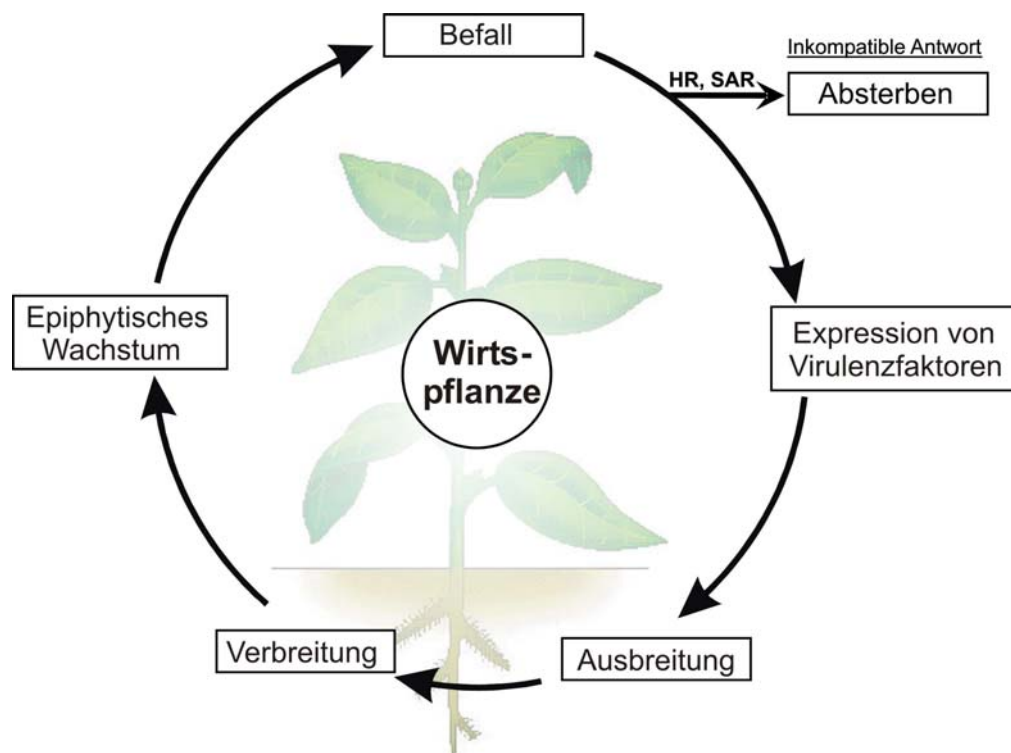


Abb. 2: **Lebenszyklus pflanzlicher Pathogene**

Der phytopathogene Lebenszyklus teilt sich im Wesentlichen in zwei Lebensabschnitte. Während der epiphytischen Wachstumsphase verbreitet sich das Pathogen auf der Pflanzenoberfläche auf der Suche nach neuen, lebensfreundlichen Habitaten. Unter guten endogenen Bedingungen und durch mögliche Eintrittsstellen, wie Stomata oder Wunden, kann das Pathogen ins Pflanzengewebe eindringen. In einer inkompatiblen Wirt-Pathogen-Beziehung wird das Pathogen von der Pflanze erkannt und die pflanzliche Abwehr aktiviert (HR – hypersensitive Reaktion, SAR – systemisch erworbene Abwehrreaktion).

In der kompatiblen Interaktion bleibt das Pathogen unentdeckt und kann sich ungehindert im Gewebe der Pflanze vermehren. Durch Expression von Virulenzfaktoren (z. B. Toxinen) wird das umgebene Pflanzengewebe angegriffen und Nährstoffe freigesetzt. Es kommt zur Ausprägung der Krankheitssymptome, wovon wiederum eine Verbreitung des Erregers ausgehen kann. (verändert nach Wensing 2006)

natürliche Öffnungen, wie Stomata oder Wunden, wobei natürliche mechanische Abwehrbarrieren (Cuticula, Zellwand) leicht überwunden werden (Montesinos *et al.*, 2002; Agrios, 2005). Bei einer kompatiblen Interaktion bleibt das Pathogen vom Wirt unerkannt oder ist in der Lage, pflanzliche Abwehrmechanismen zu unterdrücken (Staskawicz *et al.*, 2001). Anschließend wird die Expression von Virulenzfaktoren induziert, und durch zunehmende Ausbreitung des Erregers im Pflanzengewebe kommt es zu sichtbaren Symptomen, wie z. B. Chlorosen, Nekrosen oder Welken. Gleichzeitig mit dem Auftreten dieser Symptome verbreitet sich das Pathogen im Ökosystem (Abb. 2). Das Umschalten vom epiphytischen zum pathogenen Lebensstil ist genau reguliert, wobei die Kommunikation innerhalb einer Pathogenpopulation eine sehr große Rolle spielt. Diese Art der Kommunikation bezeichnet man als Quorum sensing (Staskawicz *et al.*, 2001; Lugtenberg *et al.*, 2002). Das über die *N*-Acyl-homoserinlactone (AHLs) vermittelte Kommunikationssystem induziert bei vielen pflanzenassoziierten Erregern Virulenzfaktoren und Pathogenität (Shaw *et al.*, 1997; von Bodman *et al.*, 2003).

Bei einer inkompatiblen Interaktion erkennt der Wirt das Pathogen, und eine Reihe von Abwehrreaktionen wird in Gang gesetzt. Die bedeutendste Antwort dabei ist die Hypersensitive Reaktion (HR), in der die Pflanze den programmierten Zelltod (Apoptose) der befallenen sowie der benachbarten Zellen auslöst und hierdurch dem Pathogen seine Lebensgrundlage entzieht. Signalmoleküle, die von den sterbenden Zellen produziert werden, spielen wiederum eine Rolle bei der Induktion weiterer Abwehrmechanismen (z. B. Defensine, Peroxidasen, Proteinaseinhibitoren). Darüber hinaus werden in benachbarten Zellen die Zellwände durch erhöhte Ligninproduktion, Vernetzung von Zellwandproteinen und Kalloseauflagerungen verstärkt und erschweren somit dem Pathogen die Ausbreitung innerhalb des Pflanzengewebes (Klement, 1963; Hutcheson, 2001). Dieser lokal begrenzten Antwort des Wirts folgt in aller Regel eine systemische Abwehrreaktion, welche unter anderem durch den Botenstoff Salicylsäure vermittelt wird (Baker *et al.*, 1997). Diese Pflanzenreaktion wird systemisch erworbene Resistenz (systemic acquired resistance, SAR) genannt (Ross, 1961; van Loon *et al.*, 1998).

Die Lebensweise nichtpathogener Mikroorganismen bzw. potentieller BKO's ist bisher weniger gut untersucht worden. Abgeleitet aus Forschungsergebnissen der Biologischen Kontrolle durch Mikroorganismen in der Rhizosphäre können verschiedene Wirkmechanismen, wie Konkurrenzausschlussprinzip, Präimmunisierung oder Antibiose, unterschieden werden (Abb. 3). Ein gut untersuchtes Beispiel in der Rhizosphäre ist die Welkekrankheit „take-all“ an verschiedenen Getreidesorten, verursacht durch den Pilz

Gaeumannomyces graminis var. *tritici*. In Langzeitstudien an „take-all“ erkrankten Monokulturen stellte man eine Abnahme der Krankheitssymptome über die Zeit fest. Verantwortlich für diesen Rückgang waren im Boden befindliche Bakterien, die den antifungalen Wirkstoff 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) bildeten (Keel *et al.*, 1996). Weitere Untersuchungen postulierten, dass die angebauten Pflanzen sogar aktiv die DAPG-Produzenten rekrutieren können, da ein Fruchtwechsel zur Folge hatte, dass die DAPG-Produzenten verschwanden und „take-all“ wieder vermehrt auftrat (Mazzola, 2002; Weller *et al.*, 2002). Eine weitere, interessante Eigenschaft der im Boden lebenden BKO ist die Fähigkeit, induzierte systemische Resistenzen (induced systemic resistance, ISR) über Botenstoffe, wie z. B. Lipopolysaccharide, Jasmonsäure oder Ethylen, durch die Wurzel zu vermitteln (Pieterse *et al.*, 2001). Analoge Wechselwirkungen zu den hier kurz beschriebenen Interaktionen zwischen Erreger, BKO und Wirt in der Rhizosphäre sind in der Phyllosphäre erst in den letzten Jahren intensiv untersucht worden.

Eine gut untersuchte Beziehung zwischen dem BKO, dem Erreger und der Pflanze

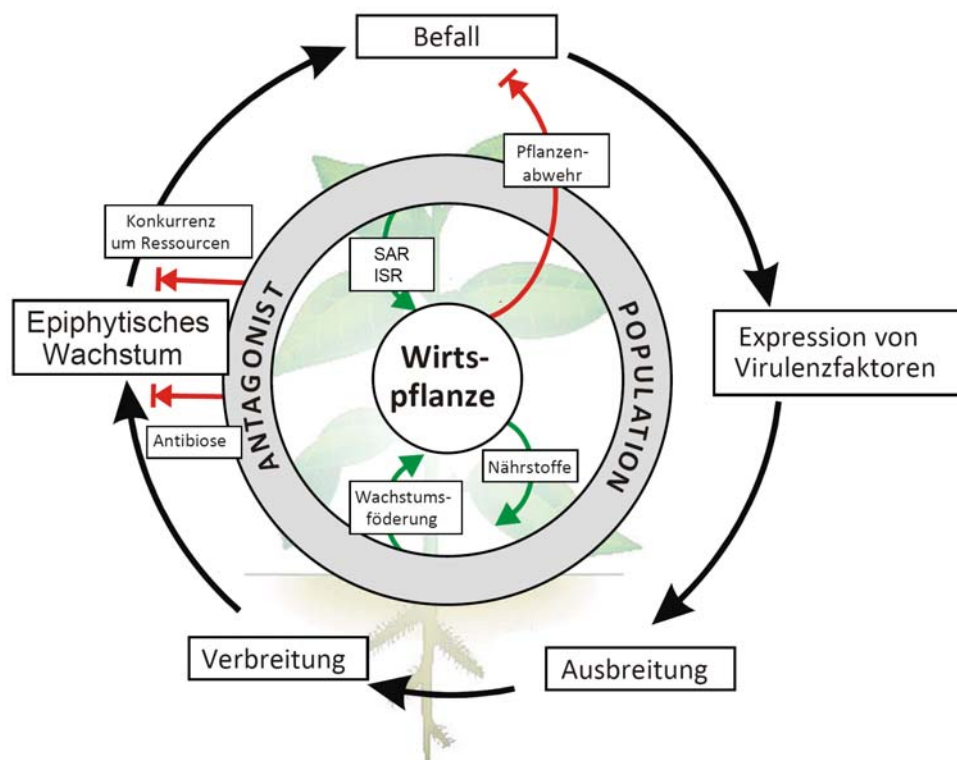


Abb. 3: **Wirkmechanismen eines potentiellen Biokontrollorganismus**

Das Schema veranschaulicht, wie ein Biokontrollorganismus (Antagonist) direkt oder indirekt die Pflanze vor Pathogenen schützen kann. Indirekte Maßnahmen sind mit grünen Pfeilen symbolisiert. In Rot sind die direkten Maßnahmen, sowohl von der Pflanze als auch vom Antagonisten, dargestellt. (verändert nach Wensing 2006).

im Bereich der Phyllosphäre ist die Präimmunisierung durch ISR. Bei dieser indirekten Interaktion wirkt der BKO wie ein inkompatibles Pathogen und schaltet die natürlichen Abwehrreaktionen der Pflanze an, wodurch das eigentliche Pathogen ausgeschlossen wird (Shoda, 2000). Im Gegensatz zur indirekten kommt es bei der direkten Interaktion zwischen Pathogen und BKO selten zu einem kompletten Ausschluss des Pathogens. Meist schwächt der BKO das Pathogen nur soweit, dass der erforderliche Schwellenwert für einen Ausbruch der Erkrankung nicht erreicht wird. Dabei ist der Konkurrenzdruck um Ressourcen als eines der wichtigsten ökologischen Prinzipien besonders wirksam und zusätzlich durch die stark schwankenden Umweltbedingungen in der Phyllosphäre erhöht. BKO und Pathogen konkurrieren ständig um Habitate mit ausreichend Nährstoffen, um stabile Population bilden zu können. Hierbei haben epiphytisch lebende BKO aufgrund der besseren Anpassung an die heterogenen Bedingungen der Phyllosphäre eine höhere Fitness als die Pflanzenerreger. Durch Aushungern oder Besetzen der besten Habitate erhält der BKO somit die Möglichkeit, die Dichte des Pathogens zu reduzieren (Janisiewicz & Korsten, 2002). Bei der Konkurrenz um Nährstoffe sind insbesondere die Spurenelemente von Bedeutung. Vor allem Konkurrenz um die Aufnahme von Eisen wurde für viele Pathogen-BKO-Beziehungen als Schlüsselfaktor in Betracht gezogen (Loper & Buyer, 1991; Handelsman & Stabb, 1996; Thomashow, 1996). Besonders fluoreszierende Pseudomonaden wurden aufgrund ihrer Produktion effektiver Eisenbindender Siderophore schon sehr früh als mögliche BKO untersucht (Kloepper *et al.*, 1980; Hamdan *et al.*, 1991; Haas *et al.*, 2000; Haas & Defago, 2005). Dabei hat sich gezeigt, dass von den Wildtypstämmen abgeleitete Siderophor-negative Mutanten oft weniger effektiv gegen phytopathogene Erreger waren als der Wildtyp (Buysens *et al.*, 1996). Ein weiterer Mechanismus der Biokontrolle ist die Unterbindung der Kommunikation (Quorum sensing, s. o.) innerhalb einer Pathogenpopulation. Hierbei werden die für die Regulation und Synthese vieler Virulenzfaktoren benötigten AHLs der Gram-negativen Bakterien durch eine von *Bacillus thuringiensis* produzierte AHL-Laktonase abgebaut. Die Folge ist eine stark eingeschränkte Pathogenität des Erregers, da Signalwege und damit die Synthese von Virulenzfaktoren unterbunden werden. Solche Systeme werden unter dem Begriff „Quorum quenching“ zusammengefasst (Dong *et al.*, 2004)

Die Antibiose durch antimikrobielle Substanzen ist der direkteste Weg ein Pflanzenpathogen zu schwächen und zeichnet sich durch drei wesentliche Vorteile aus: Erstens produziert der BKO nur die Mengen an Wirkstoff, die benötigt werden, um das

Tabelle 1: Ausgewählte Beispiele nach Raaijmakers (2002) für Antibiotika, die von potentiellen Biokontrollorganismen produziert werden.

Antibiotic ¹	Species/strain	Target pathogen ²	Origin/Host	Reference
DAPG	<i>Pseudomonas</i> spp.			
	Q2-87	Ggt	Wheat, WA, USA	Vincent et al. 1991
	CHAO	Ggt, Tb, Pu	Tobacco, Switzerland	Keel et al. 1992
	F113	Pu	Sugar beet, Ireland	Shanahan et al. 1992
	PFM2	St	Wheat, OK, USA	Levy et al. 1992
	Pf-5	Pu, Rs	Cotton, Texas, USA	Howell and Stipanovic 1979
	Q8r1-96	Ggt	Wheat, WA, USA	Raaijmakers and Weller 2001
Phenazines	<i>Pseudomonas</i> spp.			
	2-79RN ₁₀	Ggt	Wheat, WA, USA	Weller 1983
	30-84	Ggt	Wheat Kansas, USA	Pierson & Thomashow 1992
	PGS12	Fo	Corn, Belgium	Georgakopoulos et al. 1994
	In-b-109	Rs, Gg	Rice, Philippines	Rosales et al. 1995
	PCL1391	Fo	Tomato, Spain	Chin-A-Woeng et al. 1998
	PNA1	Fo, Ps	Chickpea, India	Anjaiah et al. 1998
Oomycin A	<i>P. fluorescens</i> Hv37a	Pu	Barley, USA	Gutterson et al. 1986
Pyoluteorin	<i>P. fluorescens</i>			
	Pf-5	Pu, Rs	Cotton, Texas, USA	Howell & Stipanovic 1979
	CHAO	Tb, Pu	Tobacco, Switzerland	Keel et al. 1992
Pyrrolnitrin	<i>P. fluorescens</i> BL915	Rs	Cotton, USA	Ligon et al. 2000
	<i>B. cepacia</i> B37w	Fs	Potato	Burkhead et al. 1994
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Bc, Rs	Grape, Uzbekistan	Chernin et al. 1996
	<i>Serratia</i> spp.	Vd, Rs, Ss	Oilseed rape	Kalbe et al. 1996
DDR	<i>P. borealis</i> MA342	Pt, Tc	Wheat, barley	Hokeberg et al. 1998
Viscosinamide	<i>P. fluorescens</i> DR54	Rs, Pu	Sugar beet, Denmark	Nielsen et al. 1998
Butyrolactones	<i>P. aureofaciens</i> 63-28	Pu, Pc	Canola, Canada	Gamard et al. 1997
N-BBS	<i>Pseudomonas</i> sp. AB2	Pu, Rs, Bc	Soil, Korea	Ki Kim et al. 2000
AFA	<i>S. violaceusniger</i> YCED-9	Pu	Lettuce	Trejo-Estrada et al. 1998
Pantocin A and B	<i>P. agglomerans</i> EH318	Eh	Apple, USA	Wright et al. 2001
Xanthobaccins	<i>Stenotrophomonas</i> SB-K88	Pu	Sugar beet, Japan	Nakayama et al. 1999
AFC-BC11	<i>B. cepacia</i> BC11	Rs	Soil, cotton	Kang et al. 1998
Kanosamine	<i>B. cereus</i> UW85	Pm	Alfalfa	Milner et al. 1996
Zwittermycin A	<i>B. cereus</i> UW85	Pm	Alfalfa	Silo-Suh et al. 1994

¹ DAPG – 2,4-diacetylphloroglucinol; DDR – 2,3-de-epoxy-2,3-didehydro-rhizoxin; N-BBS – N-Butylbenzenesulphonamide.

² At – *Agrobacterium tumefaciens*; Ggt – *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*; Tb – *Thielaviopsis basicola*; Pu, *Pythium ultimum*; St – *Septoria tritici*; Rs – *Rhizoctonia solani*; Fo – *F. oxysporum*; Gg – *G. graminis*; Ps – *Pythium splendens*; Fs – *Fusarium sambucinum*; Pt – *Pyrenophora teres*; Tc – *Tilletia caries*; Pc – *Phytophthora cryptogea*; Bc – *Botrytis cinerea*; Eh – *Erwinia herbicola*; Pm – *Phytophthora medicaginis*; Vd – *Verticillium dahliae*; Ss – *Sclerotinia sclerotiorum*.

Zielpathogen zu hemmen; zweitens wird der Wirkstoff nur dort freigesetzt, wo er benötigt wird (bei direkter Applikation würde dieser in großen Mengen auch im umliegenden Ökosystem verteilt und andere mikrobielle Organismen beeinflussen), und drittens wirkt der Wirkstoff nur kurze Zeit auf das Pathogen, so dass der Selektionsdruck für das Ausbilden von Resistenzmechanismen vermindert wird (Duffy *et al.*, 2003).

1.3. Antibiotika und ihre Rolle bei der Biologischen Kontrolle

Antibiotika sind eine chemisch sehr heterogene Gruppe von niedermolekularen Substanzen, die von Mikroorganismen produziert werden und in sehr geringen Konzentrationen auf das Wachstum und die metabolische Aktivität anderer Mikroorganismen wirken (Fravel, 1988).

Eine Vielzahl antibiotischer Substanzen wurde von Pseudomonaden isoliert und identifiziert (Tab. 1). Dies war möglich, da Pseudomonaden weit verbreitet in der Rhizo- und Phyllosphäre vorkommen, sich daraus sehr leicht isolieren lassen, verschiedenste Nährstoffe metabolisch nutzen können und somit leicht kultivierbar sind. Darüber hinaus sind Pseudomonaden genetisch gut manipulierbar, was die Aufklärung zahlreicher Mechanismen, wie Regulation, Biosynthese und Wirkung der Antibiotika, erleichtert. Im Allgemeinen wird aber deutlich, dass nicht die Diversität der Produzenten ausschlaggebend für die Vielzahl von Antibiotika ist, sondern dass einige wenige BKO mehrere verschiedene Antibiotika synthetisieren können (Tab.1). *Bacillus cereus* (Handelsman & Stabb, 1996), *Pantoea agglomerans* (Jin *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2006) oder *Pseudomonas fluorescens* (Keel *et al.*, 1996) zum Beispiel produzieren diverse Antibiotika mit sehr unterschiedlicher Wirkungsweise und -stärke (Tab. 1). So können BKO durch ihr breites Spektrum gebildeter Antibiotika auch ein breites Spektrum an Pflanzenpathogenen bekämpfen. Darüber hinaus weisen viele der produzierten Antibiotika selbst ein breites Wirkspektrum auf. Pyrrolnitrin (produziert von *Pseudomonas*- und *Burkholderia*-Arten) wurde schon in den 1960er Jahren identifiziert und gegen eine Vielzahl von Pathogenen positiv getestet (Nishida *et al.*, 1965; Ligon *et al.*, 2000). Verschiedene *Pseudomonas*-Arten produzieren das Toxin DAPG, welches neben antimykotischem Potential auch antibakterielle, anthelminthische und phytotoxische Eigenschaften aufweist (Keel *et al.*, 1992).

Die hier beschriebenen antimikrobiellen Substanzen der verschiedenen BKO wurden meist durch *in vitro* Analysen nachgewiesen und auf ihr Wirkungsspektrum hin untersucht. Doch gilt zu klären, welche Rolle den antimikrobiellen Wirkstoffen bei *in situ* Interaktionen zukommt. Bei BKO, die aus der Rhizosphäre isoliert wurden, konnte bereits gezeigt werden, dass auch der Kulturüberstand *in planta* eine ähnliche Wirkung aufwies wie der BKO selbst (Howell & Stipanovic, 1979; Kang *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 1999). Daraus resultierte eine maßgebliche Beteiligung der vom BKO produzierten Wirkstoffe an der Biologischen Kontrolle. Auch durch Deletion von Biosynthesegenen konnte verschiedenen Antibiotika eine bedeutende Rolle in der Biologischen Kontrolle zugewiesen werden (Vincent *et al.*, 1991; Laville *et al.*, 1992; Cronin *et al.*, 1997a), wobei Komplementierung oft den Phänotyp des BKO sowohl *in vitro* als auch *in planta* wiederherstellte. Durch Überproduktion der Toxine DAPG und Pyoluteorin aus *Pseudomonas fluorescens* CHA0 konnten Krankheitssymptome am Wurzelgewebe, verursacht durch *Pythium* spp., signifikant verringert werden (Maurhofer *et al.*, 1992). Das

Einbringen von multiplen Kopien des Regulatorgens *gacA* in *Pseudomonas fluorescens* BL915 führte zu einem Anstieg der Produktion von Pyrrolnitrin, was zu einer signifikant verbesserten Kontrolle des Erregers *Rhizoctonia solani* führte (Ligon *et al.*, 2000).

Um die Wirksamkeit eines Antibiotikums eindeutig zu belegen, müssten die verantwortlichen Biosynthesegene in einen nicht-produzierenden BKO überführt und nachfolgend seine Aktivität gegen einen oder mehrere Erreger *in planta* gezeigt werden. Dies gelang Fenton und Mitarbeitern (1992), indem sie Biosynthesegene für DAPG aus dem Stamm *Pseudomonas* sp. F113 mit Hilfe des Vektors pCU203 in den nicht-DAPG-produzierenden Stamm *Pseudomonas* sp. M114 übertrugen. Dieser modifizierte Stamm *Pseudomonas* sp. M114(pCU203) konnte den Erreger *Pythium ultimum* an der Zuckerrübe besser unterdrücken als der Wildtypstamm M114.

Die Bedeutung von Antibiotika in der Biologischen Kontrolle – vor allem in der antagonistischen Beziehung zwischen zwei Mikroorganismen – wurde sehr lang kontrovers diskutiert, da nur unzureichend geklärt werden konnte, ob ein Antibiotikum *in situ* überhaupt produziert wird (Gottlieb, 1976; Williams & Vickers, 1986). Doch der direkte Nachweis von Toxinen ist durch die Komplexität ihrer natürlichen Umgebung sehr schwierig. Um Antibiotikaproduktion *in situ* zu beobachten, ist die Integration von Reportergenen möglich (Lindow, 1995). Reportergene werden häufig verwendet, um Populationsdynamiken *in situ* zu beobachten, es können damit aber auch Transkriptionsaktivitäten untersuchter Gene (z. B. der Antibiotikasythese) *in situ* sichtbar gemacht werden. Es ist mit dieser Methode jedoch unmöglich, eine quantitative Bestimmung der zu untersuchenden Antibiotika durchzuführen. Dies erfolgt mit Hilfe der chemischen Analytik, beispielsweise durch die Aufreinigung mittels „high-pressure liquid chromatography“ (HPLC). Nach erfolgreicher Extraktion und Auftrennung folgen weitere Analysen (Massenspektroskopie (MS), NMR-Spektroskopie, etc.), was in den vergangenen Jahren zum Nachweis vieler Antibiotika *in situ* führte (Thomashow *et al.*, 1997; Raaijmakers *et al.*, 1999; Raaijmakers *et al.*, 2002).

Neben dem Nachweis ist die Frage zu beantworten: Was beeinflusst die Antibiotikabildung *in situ*? Bei BKO, im Speziellen bei der Gattung *Pseudomonas*, ist die Antibiotikaproduktion abhängig von einer Vielzahl endogener Faktoren, wie z. B. dem Zwei-Komponenten-Regulationssystem GacS/GacA (Gaffney *et al.*, 1994), der Zelldichte-abhängigen Regulation durch Quorum sensing (Wood *et al.*, 1997) sowie der Transkriptionsregulation durch verschiedene Sigmafaktoren (Sarniguet *et al.*, 1995). Exogene Faktoren wurden im Vergleich zu den endogenen Faktoren bislang weniger

intensiv untersucht. Allerdings ist bekannt, dass Temperatur (Shanahan *et al.*, 1992), Bodenfeuchte (Georgakopoulos *et al.*, 1994) und pH-Wert (Ownley *et al.*, 1992) sich auf die Toxinproduktion auswirken. Der pH-Wert wird sogar in Verbindung mit der Aktivität einzelner Toxine diskutiert. Chin-A-Woeng und Mitarbeiter (1998) beobachteten, dass antimykotische Phenazinderivate eine unterschiedlich starke Wirkung *in vitro* in Abhängigkeit vom pH-Wert besaßen. Im extrem sauren pH-Milieu verloren manche Phenazinderivate sogar vollständig ihre toxische Wirkung, so dass man schlussfolgerte, dass die unterschiedliche Aktivität der Phenazin-produzierenden Stämme auf die unterschiedliche Derivatisierung des Phenazins *in situ* zurückzuführen ist. Weiterhin ist auch die Abhängigkeit von Nährstoffen, welche von der Pflanze in Rhizo- und Phyllosphäre zur Verfügung gestellt werden, ein wichtiger endogener Faktor, der die Produktion von antimikrobiellen Wirkstoffen beeinflusst (Milner *et al.*, 1996). Duffy und Defago (1999) untersuchten bei *Pseudomonaden* die Abhängigkeit der DAPG-Produktion von verschiedenen Kohlenstoffquellen und von anorganischem Phosphat. Glukose förderte demnach die Produktion von DAPG bei allen untersuchten *Pseudomonaden*, wohingegen anorganisches Phosphat die Produktion von DAPG bei einigen Stämmen stark einschränkte. Phosphat setzte auch die Produktion anderer Antibiotika herab, wie beispielsweise die des von *Bacillus cereus* synthetisierten Kanosamins (Milner *et al.*, 1996) und des von *P. fluorescens* produzierten Phenazins (Slininger & Jackson, 1992). Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob der intensive Einsatz von Phosphatdünger in der Landwirtschaft nicht die natürlich vorkommenden, aber auch die künstlich eingebrachten BKO in ihrer Wirkung einschränkt (Duffy & Defago, 1999). Die hier gezeigten Beispiele machen deutlich, dass die von den BKO produzierten Antibiotika in vielen Biokontrollsystemen eine übergeordnete Rolle spielen.

1.4. Biologische Kontrolle des Bakterienbrandes der Sojabohne

Die Interaktionen zwischen der Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.) und dem Erreger des Bakterienbrandes *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg) wurden als Modelsystem für Pflanzen-Mikroben-Interaktionen intensiv untersucht. Die Virulenzfaktoren dieses Pathogens sind bekannt, und besonders ihre Biosynthese und Regulation sind detailliert studiert worden (Bender *et al.*, 1999; Smirnova & Ullrich, 2004; Weingart *et al.*, 2004). Des Weiteren wurden die Mechanismen der Pflanzenabwehr bei der Sojabohne bei kompatibler und inkompatibler Interaktion aufgeklärt, und der Einfluss verschiedener Virulenzfaktoren wurde experimentell überprüft (Cui *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2005).



Abb. 4: **Der Bakterienbrand der Sojabohne**

Die hier gezeigten Blatflecken – braune Nekrosen umrahmt von Chlorosen – sind typische Symptome des Bakterienbrands verursacht durch den Erreger *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. (Quelle: Coerper 1919)

Das in dieser Studie vorgestellte Modellsystem befasst sich mit dem Antagonisten gegen den Erreger des Bakterienbrandes *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d). Pss22d ist ein stäbchenförmiges, Gram-negatives Bakterium, welches taxonomisch zur Gruppe der γ -Proteobakterien gehört. In früheren Arbeiten wurde Pss22d als sehr effizienter BKO gegen das Pathogen Psg *in vitro* sowie *in planta* unter Gewächshaus- und Feldbedingungen getestet (May *et al.*, 1997; Völksch & May, 2001). Allerdings fehlte grundlegendes Wissen über den Mechanismus dieser antagonistischen Wechselbeziehung zwischen dem Pathogen und dem BKO Pss22d

Die Pflanzen-assoziierte Art *Pseudomonas syringae* wird taxonomisch je nach Wirtsspezifität in mehr als 50 Pathovaren unterteilt (Doudorof & Palleroni, 1974; Young *et al.*, 1996). Die Pathovarietät *glycinea* wurde erstmals 1919 als Blatflecken verursachendes Bakterium beschrieben, welches braune Nekrosen umrahmt von Chlorosen verursacht (Coerper, 1919) (Abb. 4). Psg ist ein Kaltwetterpathogen, das oft nach einer kalten und feuchten Wetterperiode Symptome verursacht. Studien über Virulenzfaktoren ergaben, dass diese Faktoren stark von der Temperatur abhängig sind (Smirnova & Ullrich, 2004; Weingart *et al.*, 2004). Detailliert wurde das von Psg produzierte Toxin Coronatin

untersucht und gezeigt, dass es für die gelblichen Chlorosen des befallenen Pflanzengewebes verantwortlich ist. Strukturell ist Coronatin dem Phytohormon Methyljasmonat von Pflanzen sehr ähnlich und induziert einen systemischen Abwehrmechanismus gegen Insekten. Durch diese irreführende Induzierung umgeht das Pathogen die eigentliche bakterielle Abwehrreaktion SAR und befällt das Pflanzengewebe ungehindert (Cui *et al.*, 2005).

Pss22d wurde 1993 als möglicher BKO von der Sojabohne isoliert (Völksch *et al.*, 1996). Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 82 epiphytisch lebende Bakterien von gesunden Sojablättern isoliert und in *in vitro* und *in planta* Versuchen auf ihre antagonistische Wirkung auf den Erreger des Bakterienbrandes untersucht. Pss22d hemmte sowohl *in vitro* als auch *in planta* sehr erfolgreich das Wachstum des Pathogens Psg. Pss22d eignet sich somit hervorragend für detaillierte Untersuchungen als Modellorganismus der Biologischen Kontrolle. Des Weiteren zeigte der BKO Pss22d sowohl unter Gewächshaus- als auch unter Feldbedingungen hervorragende epiphytische Eigenschaften. Im Gewächshaus bildete Pss22d auf künstlichen Wunden an Sojablättern über Wochen eine stabile Population von ca. 10^4 cfu/Wunde (May *et al.*, 1997). Auch im Feldversuch wurde nach mehreren Wochen noch eine Populationsdichte von mehr als 10^6 cfu/g Frischmasse nachgewiesen, was bis zu 40 % der Gesamtpopulation an Epiphyten auf der Sojapflanze ausmachte. Nach Koinokulation des BKO Pss22d mit dem Pathogen Psg auf Sojapflanzen kam es zu einer signifikanten Reduktion der Populationsdichte des Pathogens und zu keiner Ausprägung der Krankheitssymptome. Eine noch bessere Reduktion des Pathogens wurde erreicht, wenn der Antagonist Pss22d vier Wochen vor dem Pathogen ausgebracht wurde (Völksch & May, 2001). Diese detaillierten Untersuchungen zeigten, dass Pss22d eine sehr gute epiphytische Fitness und eine hervorragende antagonistische Wirksamkeit besitzt.

Analog zu den gut untersuchten Mechanismen der Biologischen Kontrolle in der Rhizosphäre kommen in diesem Modell die Antibiose und die Siderophorproduktion als mögliche Mechanismen in Frage. Untersuchungen Siderophor-negativer Mutanten *in planta* ergaben, dass die antagonistische Wirkung dieser Mutanten der des Wildtypstamms Pss22d entsprach. Daher scheinen die von Pss22d gebildeten Siderophore in der antagonistischen Beziehung keine bedeutende Rolle zu spielen (Wensing, 2006). Dagegen konnte gezeigt werden, dass Pss22d drei antimikrobielle Wirkstoffe bildet.

Zwei der von Pss22d gebildeten Toxine Syringomycin und Syringopeptin wurden bereits intensiv untersucht (Bender *et al.*, 1999; Scholz-Schroeder *et al.*, 2001a; Fogliano *et*

al., 2002). Syringomycin gehört zu den Lipodepsinonapetiden und besteht aus einem polaren Cyclopeptid aus 9 Aminosäuren, welches über eine Amidbindung mit einer hydrophoben Fettsäure verbunden ist. Syringopeptin gehört zu den Lipodepsipeptiden, die im Gegensatz zu den Lipodepsinonapeptiden, ein Cyclopeptid aus bis zu 25 Aminosäuren besitzen. Durch die amphipathische Lipopeptidstruktur beider Toxine kommt es zum Einbau in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran, wodurch Membranporen entstehen und die Permeabilität stark erhöht wird. Der ungehinderte Ein- und Ausstrom von Kationen (z. B. Kalium-, Wasserstoff- und Kalziumionen) führt letztendlich zum Zelltod (Bender *et al.*, 1999). Beide Toxine spielen bei der Lagerhaltung von Nahrungsmitteln eine bedeutende Rolle, wo vor allem die zwei *P. syringae* Stämme ESC-10 (Bio-save 10) und ESC-11 (Bio-save 11) als BKO gegen Blau- und Grauschimmel an verschiedenen Zitrusarten eingesetzt werden (Bull *et al.*, 1997; Stockwell & Stack, 2007).

Bei dem dritten von Pss22d produzierten Wirkstoff handelt es sich um ein neuartiges Antibiotikum, welches das Pathogen Psg *in vitro* spezifisch hemmt. Der Wirkmechanismus dieses Antibiotikums wurde noch nicht näher untersucht, jedoch kann die *in vitro* verursachte Wachstumshemmung von Psg durch Zugabe der Aminosäure L-Arginin aufgehoben werden. Somit liegt nahe, dass der Wirkstoff als Enzyminhibitor in der Arginin-Biosynthese oder in einem Arginin-abhängigen Stoffwechselweg wirken könnte (Völksch *et al.*, 1996).

1.5. Zielstellung

Der Epiphyt *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d) hemmt effektiv den Erreger des Bakterienbrandes der Sojabohne, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg) (Völksch & May, 2001). Die bemerkenswerten antagonistischen Eigenschaften von Pss22d sowie die vorhandenen Kenntnisse über das Pathogen und die Sojabohne legen die Auswahl dieser drei Organismen als Modellsystem für das Studium mikrobieller Interaktionen in der Phyllosphäre nahe. Aufgrund der bisherigen *in vitro* Studien wurde vermutet, dass die durch Pss22d produzierten Antibiotika eine bedeutende Rolle in der Biologischen Kontrolle des Pflanzenpathogens Psg spielen. Neben den beiden bekannten Toxinen Syringomycin und Syringopeptin produziert Pss22d ein weiteres unbekanntes Toxin, welches bereits von Völksch und Mitarbeitern (1996) durch Agardiffusionstests nachgewiesen wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob die von Pss22d gebildeten Toxine eine Rolle bei der Biologischen Kontrolle des Bakterienbrandes der Sojabohne spielen. *In*

planta Untersuchungen mit Toxin-negativen Mutanten für Syringopeptin, Syringomycin und das noch unbekannte Toxin sollten erste Hinweise über ihre Bedeutung im Antagonismus liefern.

Folgende Vorgehensweise war geplant, um den hier vorgestellten Antagonismus im Detail zu untersuchen:

Da das unbekannte Toxin von Pss22d durch den Agardiffusionstest mit dem Indikatorstamm Psg nachgewiesen werden konnte, sollte dieses durch Agardiffusionstests-geleitete Fraktionierung isoliert und anschließend identifiziert werden. Dazu wird das unbekannte Toxin mittels Ionenaustauschchromatographie angereichert, mittels RP-HPLC aufgereinigt und über HR-ESI-MS/MS und NMR-Spektroskopie strukturell charakterisiert. Die Biosynthese des Toxins sollte durch Verfütterung markierter Vorstufen analysiert werden, um erste Rückschlüsse über die beteiligten Enzyme ziehen zu können. Dazu wird der mögliche Einbau von Stabilisotopen-markierten Vorstufen in das Toxin mittels ESI-MS/MS und NMR-Spektroskopie untersucht. (Manuskript I)

Im nächsten Schritt sollten die Biosynthesegene des bisher unbekannten Toxins identifiziert werden. Da das Genom von Pss22d nicht bekannt ist, wird hierfür eine mini-Tn5-Transposon vermittelte Mutagenese eingesetzt, bei der durch zufälligen Einbau eines Resistenzmarkers in das Genom von Pss22d Mutanten erzeugt werden. Um Toxin-negative Mutanten zu finden, wird der Agardiffusionstest mit Psg als Indikatorstamm genutzt. Pss22d-Mutanten, die das neue Toxin nicht produzieren, können somit genutzt werden, um die an die Transposon-Integrationsstelle angrenzenden Gene zu sequenzieren. Ausgehend von dieser Sequenzinformation sollten weitere Gene der Toxinbiosynthese durch „gene-walking“-Experimente identifiziert werden. Mit dieser Methode können neben Biosynthesegenen auch regulatorische Gene analysiert werden. (Manuskript I, II)

Zur Bestätigung des möglichen Toxin-Biosynthesegenclusters werden Komplementierungsexperimente mit Toxin-negativen Mutanten durchgeführt. Weiterhin sind eine heterologe Expression des neuen Wirkstoffes in einem nicht-produzierenden Stamm (z. B. *E. coli*) und eine funktionelle Charakterisierung ausgewählter Biosynthesenzyme möglich. (Manuskript II)

Die Deletion der bekannten Antibiotika Syringomycin und Syringopeptin kann hingegen durch „marker exchange mutagenesis“ gezielt erfolgen, da ihre Gencluster bereits bekannt sind (Scholz-Schroeder *et al.*, 2001b). Zur Identifizierung Syringomycin-negativer und Syringopeptin-negativer Mutanten werden die Indikatorstämme *Geotrichum candidum* bzw. *Bacillus megaterium* im Agardiffusionstest verwendet. (Manuskript III)

Die Toxin-negativen Pss22d-Mutanten sollten anschließend in Koinokulationversuchen mit dem Erreger des Bakterienbrandes Psg an Sojapflanzen im Gewächshaus auf ihre antagonistische Wirkung untersucht werden, um die Bedeutung der verschiedenen Antibiotika für die Biologische Kontrolle zu verifizieren. Als Kontrolle und zum Vergleich mit den Koinokulationsversuchen werden alle untersuchten Stämme/Mutanten in Einzelinokulation mitgeführt. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob das unbekannte Toxin von Pss22d auch *in planta* gebildet wird. (Manuskript III)

2. Übersicht der Manuskripte

I Braun, S. D., B. Völksch, J. Nüske, and D. Spiteller

3-Methylarginine from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 suppresses the bacterial blight caused by its close relative *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.
publiziert in: *ChemBioChem* 9 (2008), 1913-1920

Durch die Kombination molekularbiologischer und chemisch-analytischer Methoden wurde die Struktur des dritten, von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 produzierten Toxins identifiziert. Es handelt sich um die nicht-proteinogene Aminosäure 3-Methyl-L-Arginin, die sich nur durch die Methylgruppe in Position 3 vom L-Arginin unterscheidet. Über Markierungsexperimente mit Deuterium-markiertem Methionin konnte nachgewiesen werden, dass der Einbau der Methylgruppe über eine S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methyltransferase vermittelt wird. Durch Tn5-Mutagenese wurde die 3-Methylarginin-negative Mutante Pss22d.1 erzeugt, die einen Defekt im Gen für eine SAM-abhängige Methyltransferase zeigte. Dieses Enzym wurde als Teil des Biosynthesegenclusters von 3-Methylarginin identifiziert. Ein Biosyntheseweg für 3-Methylarginin wurde abgeleitet.

Die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen und mikrobiellen Arbeiten und die Auswertung der daraus entstandenen Ergebnisse wurden von mir durchgeführt. Das Anreichern des Antibiotikums 3-Methylarginin wurde von mir mittels Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Hilfe bei der Optimierung der Ionenaustauschchromatographie erhielt ich durch J. Nüske. Die Aufreinigung von 3-Methylarginin mittels RP-HPLC und die Strukturidentifizierung mittels HR-ESI-MS/MS und NMR-Spektroskopie wurden von D. Spiteller durchgeführt. Den Hauptteil des Manuskripts wurde von mir selbst verfasst, wobei D. Spiteller mich beim chemisch-analytischen Teil dieses Manuskripts anleitete. B. Völksch hat diese Publikation durch ihr DFG-Projekt (VO 558/6-3) angeregt und das Manuskript korrigiert, ergänzt und verbessert.

II Braun S. D., J. Hofmann, A. Wensing, M. S. Ullrich, H. Weingart, B. Völksch, D. Spiteller

Identification of the biosynthetic gene cluster of 3-methylarginine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93.

eingereicht bei: *Applied and Environmental Microbiology*

Der 3-Methylarginin-Biosynthesegencluster wurde in dieser Arbeit detailliert beschrieben. Für die Charakterisierung des Biosynthesegenclusters wurde die 3-Methylarginin-negative Mutante Pss22d.1, die einen Defekt in einer SAM-abhängigen-Methyltransferase aufweist, genutzt. In direkter Nachbarschaft zur SAM-abhängigen-Methyltransferase wurden zwei weitere Gene identifiziert, die hohe Homologien zu einer Aminotransferase bzw. einem unspezifischen Aminosäure-Exporter aufwiesen. Nach erfolgreicher Klonierung des 3-Methylarginin-Biosynthesegenclusters, welcher die Gene für eine Methyltransferase, eine Aminotransferase und einen Aminosäure-Exporter umfasst, konnte über Komplementierungsversuche in Pss22d.1 und *E.coli* DH5 α nachgewiesen werden, dass alle drei identifizierten Gene zur Synthetisierung und Sekretion von 3-Methylarginin notwendig sind. Das Schlüsselenzym für die 3-Methylarginin-Produktion, die Methyltransferase, wurde heterolog in *E.coli* überexprimiert und anschließend charakterisiert. Dieses Enzym überträgt die Methylgruppe vom SAM auf die Vorstufe 5-Guanidino-2-oxo-pentansäure zu 5-Guanidino-3-methyl-2-oxo-pentansäure. Zusätzlich wurden mit weiteren Tn5-Mutanten, die eine gestörte 3-Methylarginin-Produktion aufwiesen und zusätzlich eines der beiden anderen Toxine (Syringomycin, Syringopeptin) nicht produzierten, mögliche Regulatoren der Biosynthese von 3-Methylarginin identifiziert.

Die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen und mikrobiellen Arbeiten, und die Auswertung der daraus entstandenen Ergebnisse wurden von mir durchgeführt. J. Hofmann hat in ihrer von mir betreuten Diplomarbeit die SAM-abhängige Methyltransferase durch heterologe Expression isoliert und charakterisiert. Die Synthese des Substrats für die SAM-abhängige Methyltransferase und der *in vitro* Nachweis des Einbaus der Methylgruppe in 3-Methylarginin wurden von D. Spiteller durchgeführt. Den Hauptteil des Manuskripts wurde von mir verfasst, wobei D. Spiteller mich im chemisch-analytischen Teil anleitete. M. Ullrich, A. Wensing und H. Weingart gaben mir nützliche Hinweise bei den molekular-biologischen Arbeiten und beim Verfassen des Manuskripts. B. Völksch hat diese Publikation durch ihr DFG-Projekt (VO 558/6-3) angeregt und das Manuskript korrigiert, ergänzt und verbessert.

III Braun, S. D., J. Hofmann, A. Wensing, H. Weingart, M. S. Ullrich, D. Spiteller, and B. Völksch

In vitro antibiosis by *Pseudomonas syringae* Pss22d, acting against the bacterial blight pathogen of soybean plants, does not influence *in planta* biocontrol.

eingereicht bei: *Journal of Phytopathology*

Mit Hilfe Toxin-negativer Mutanten sollte geklärt werden, ob die Toxine Syringomycin, Syringopeptin oder 3-Methylarginin den von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d) vermittelten Antagonismus gegen das Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg) beeinflussen. Dafür wurde mittels „marker-exchange-mutagenesis“ eine Syringopeptin/Syringomycin-negative Doppelmutante Pss22d.ΔsypA/syrE erzeugt. Der Wildtyp Pss22d, die 3-Methylarginin-negative Mutante Pss22d.1 und die Doppelmutante Pss22d.ΔsypA/syrE wurden *in vitro* charakterisiert und *in planta* auf ihre antagonistischen Fähigkeiten hin überprüft. Doch sowohl Pss22d.ΔsypA/syrE als auch Pss22d.1 unterdrückten das Pathogen Psg ebenso effizient wie der Wildtyp Pss22d. Außerdem wurde gezeigt, dass 3-Methylarginin auch *in situ* von Pss22d produziert wird, und in aufgereinigter Form *in planta* wirksam ist.

Die Erzeugung sämtlicher Mutanten und deren Charakterisierung wurden von mir durchgeführt. Auch die *in planta* Versuche wurden von mir geplant und durchgeführt. Das in den Pflanzenversuchen eingesetzte reine 3-Methylarginin wurde von mir mittels Ionenaustauschchromatographie angereichert und von D. Spiteller mittels RP-HPLC aufgereinigt. Den Hauptteil des Manuskripts habe ich verfasst. M. Ullrich, A. Wensing und H. Weingart gaben mir nützliche Hinweise bei den molekular-biologischen Arbeiten und beim Verfassen des Manuskripts. B. Völksch hat diese Publikation durch ihr DFG-Projekt (VO 558/6-3) angeregt, und das Manuskript korrigiert, ergänzt und verbessert.

3. Manuskripte

3.1. Manuskript I

Braun, S. D., B. Völksch, J. Nüske, and D. Spiteller

3-Methylarginine from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 suppresses the bacterial blight caused by its close relative *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.

publiziert in: ChemBioChem 9 (2008), 1913-1920

3-Methylarginine from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 Suppresses the Bacterial Blight Caused by Its Close Relative *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Sascha D. Braun,^[c] Beate Völksch,^{*,[c]} Jörg Nüske,^[b] and Dieter Spiteller^{*,[a]}

In memoriam Dr. Jonathan B. Spencer.

The epiphyte *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d) produces a toxin that strongly inhibits the growth of its relative, the plant pathogen *P. syringae* pv. *glycinea*. The inhibition can be overcome by supplementing the growth medium with the essential amino acid, L-arginine; this suggests that the toxin acts as an inhibitor of the arginine biosynthesis. The highly polar toxin was purified by bioassay-guided fractionation using ion-exchange chromatography and subsequent RP-HPLC fractionation. The structure of the natural product was identified by HR-ESI-MS, HR-ESI-MS/MS, and NMR spectroscopy experiments as 3-

methylarginine. This amino acid has previously only been known in nature as a constituent of the peptide lavendomycin from *Streptomyces lavendulae*. Results of experiments in which labeled methionine was fed to Pss22d indicated that the key step in the biosynthesis of 3-methylarginine is the introduction of the methyl group by a S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferase. Transposon mutagenesis of Pss22d allowed the responsible SAM-dependent methyltransferase of the 3-methylarginine biosynthesis to be identified.

Introduction

Members of the genus *Pseudomonas* are widespread rod-shaped Gram-negative bacteria with remarkable metabolic versatility. The genus not only harbors many plant and human pathogens but also comprises species that promote plant growth, antagonize plant pathogenic microorganisms, or induce resistance in plants.^[1] Their ability to produce a variety of secondary metabolites that inhibit the growth of other microorganisms^[2] makes fluorescent pseudomonads attractive biological control agents against plant pathogens, in particular, the closely related *Pseudomonas syringae*, which cause severe economic losses worldwide.^[3] Like most phytopathogenic bacteria that are not obligate parasites and survive in a wide range of habitats, *P. syringae* pathogens have been identified from many plants and soil.^[3,4] *P. syringae* pv. *syringae* is one of the most abundant pathovars of this species in nature.

In recent years, interest in the biological control of bacterial plant diseases by using naturally occurring epiphytic bacteria has increased. The screening for antagonistic epiphytes against *P. syringae* plant pathogens has identified *P. syringae* pv. *syringae* strain 22d/93 (Pss22d) as a promising biocontrol agent. Pss22d was isolated from a soybean leaf that did not show any disease symptoms.^[5] The antagonism of Pss22d against bacterial blight of soybean caused by *P. syringae* pv. *glycinea* (Psg; Figure 1 A) has been successfully demonstrated in vitro, in planta, and under field conditions.^[5,6] As siderophore production of Pss22d was excluded as an active principle of this antagonism,^[7] its toxins attracted our attention. In addition to producing the common (among *P. syringae* pv. *syringae*) syringomycin and syringopeptin,^[8,9] Pss22d produces a hydrophilic low-molecular-weight toxin the structure of which is so far unknown;

this toxin was identified to selectively inhibit Psg but no other pseudomonads (Figure 1 B).^[5] This inhibition can be compensated for by L-arginine supplementation (Figure 1 C) but not by any other essential amino acid; this suggests that the toxin influences arginine biosynthesis.^[5] Herein, we describe the isolation, structure elucidation, and biosynthesis of this novel toxin produced by Pss22d isolated from soybean.

Results and Discussion

Toxin production and purification

In order to identify the toxin produced by Pss22d that specifically inhibits Psg, its production was optimized by using vari-

[a] Dr. D. Spiteller
Max Planck Institute for Chemical Ecology, Bioorganic Chemistry
Hans-Knöll-Strasse 8, 07745 Jena (Germany)
Fax: (+49) 3641-57-1002
E-mail: dspiteller@ice.mpg.de

[b] Dr. J. Nüske
Institut für Mikrobiologie
Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Philosophenweg 12, 07743 Jena (Germany)

[c] S. D. Braun, Dr. B. Völksch
Institut für Mikrobiologie, Mikrobielle Phytopathologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Neugasse 25, 07743 Jena (Germany)
Fax: (+49) 3641-94-9292
E-mail: beate.voelksch@uni-jena.de

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chembiochem.org> or from the author.

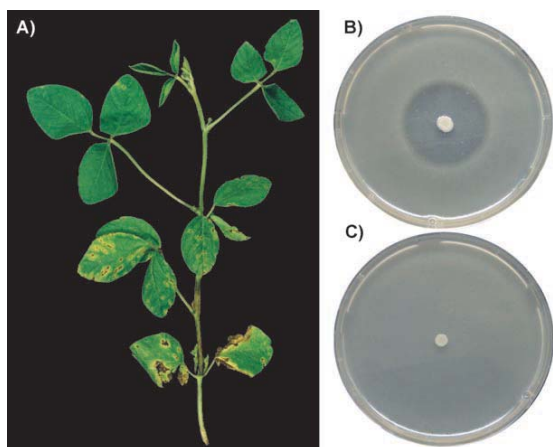


Figure 1. A) Bacterial blight disease caused by the plant pathogen *P. syringae* pv. *glycinea* (Psg) on *Glycine max* (soybean); B) growth inhibition of the plant pathogen Psg by *P. syringae* pv. *syringae* 22d/93 in vitro (white colony in the middle of the plate); C) compensation of Psg growth inhibition by addition of L-arginine (100 mM) to the medium.

ous growth media and temperatures. Highest toxin activity was detected in HSC medium at 28 °C. The growth curve of Pss22d indicated that the toxin is already synthesized during the exponential growth phase (Figure 2).

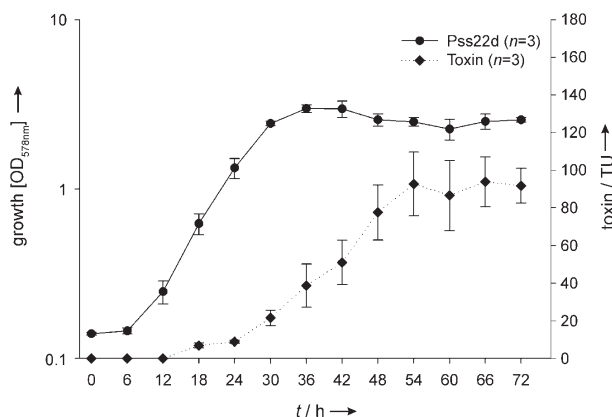


Figure 2. Growth of Pss22d in HSC liquid media at 28 °C for 72 h ($n=3$) and toxin production ($n=3$; TU: toxin units).

Toxin production at the beginning of the log phase is rather untypical for microbial secondary metabolite formation, such as antibiotics or toxins. Their production is often initiated in response to quorum sensing signals at the end of the stationary growth phase.^[10] As we have observed in Pss22d toxin formation, other secondary metabolites from *P. syringae* pathovars, for example, coronatine, are known to be produced during the growth phase.^[11] Pss22d reached its maximum toxic activity after 48 h and maintained a constant level (t -test, $p < 0.05$). The toxic activity of the cell-free filtrates remained despite expo-

sure to drastic pH values (pH 3–12) and temperatures of up to 121 °C.

Initial purification experiments revealed that the toxin is highly polar and cannot be extracted with organic solvents. Nevertheless, it was soluble in methanol and binds to ion-exchange resins such as CM-Sephadex, C-25. In order to elucidate the toxin structure, Pss22d was grown in HSC liquid medium (1 L) for 48 h at 28 °C. The culture supernatant was extracted with ethyl acetate and the bioactive water phase was freeze-dried, taken up in methanol, and purified by ion-exchange chromatography. The obtained fractions were analyzed in agar-diffusion assays for bioactivity against the plant pathogen Psg. Active fractions were eluted with ammonium hydrogen carbonate (0.3 M) from the ion-exchange resin. HPLC separation on a Phenomenex Synergy polar RP in combination with ESI-MS detection allowed us to collect the fractions that contained the pure toxin.

Structure elucidation

The toxin eluted at 3.7 min from the Phenomenex polar RP HPLC column and exhibited a quasimolecular ion at m/z 189. High-resolution ESI-MS suggested the molecular formula $C_7H_{17}N_4O_2$, which indicates the presence of two double bond units. Considering the physicochemical behavior of the toxin together with its HR-ESI-MS, and the observation that the toxicity of the compound could be compensated for when L-arginine (**2**) is supplied to the medium,^[5] an amino-acid-like structure was suspected (Figure 3).

Comparison of the ESI-MS/MS spectrum of the toxin with that of arginine (**2**) revealed a highly similar fragmentation pattern. The shift of 14 amu for most of the fragments (175→189, 157→171, 158→172, 130→144, 116→130, 112→126, 70→84) pointed to an arginine derivative with an extra methyl group (Figure 3). In order to prove the deductions and to identify the position of the extra methyl group, 1D and 2D NMR spectra were recorded from the purified toxin (1 L; yield about 1 mg L⁻¹). In the ¹H NMR spectrum (MeOD, 500 MHz, 300 K) a doublet signal that accounted for a 3-CH₃ group at 0.91 ppm was observed, and showed a cross-signal in the H₁H-COSY to the 3-CH group adjacent to the 2-CH-NH₂ moiety of an α -amino acid. Moreover, signals corresponding to a -CH₂-CH₂-chain were observed from the 3-CH group in the direction of the guanidine residue. In addition, the APT and HSQC spectra supported the deductions and proved the presence of a carboxyl group (signal at 171.7 ppm) as well as the imino group (signal at 158.8 ppm) of the expected guanidine moiety (see the Supporting Information).

By combining the obtained spectral information, the toxin from Pss22d was identified to be 3-methylarginine (**1**). This amino acid has so far not been found to occur as a free amino acid in nature but it has been characterized previously as an amino acid component of the peptide antibiotic lavendomycin from *Streptomyces lavendulae*.^[12]

Attempts to address the stereochemistry of 3-methylarginine (**1**) by NMR spectroscopy and derivatization methods failed because of the limited sample material. However, treatment of

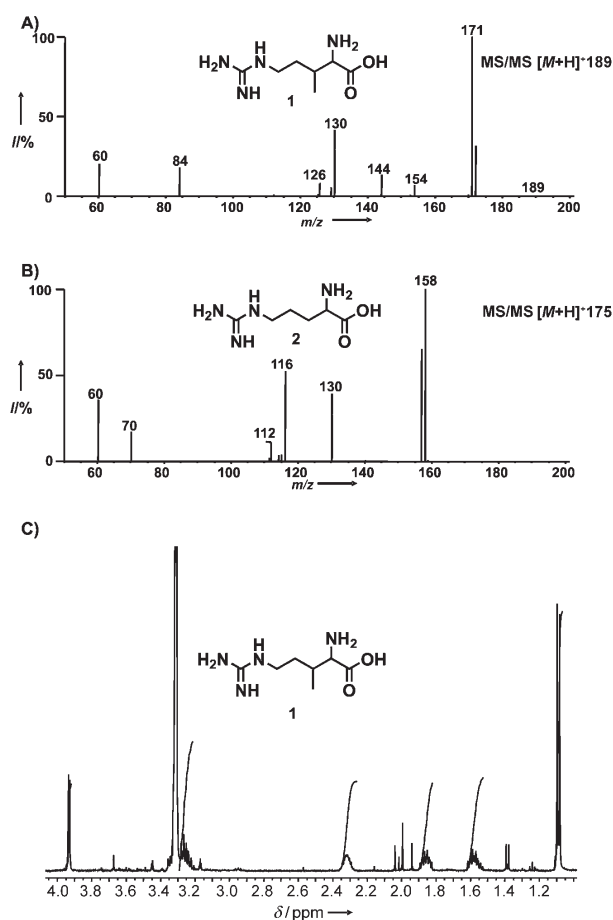


Figure 3. A) LC-ESI MS/MS of the $[M+H]^+$ 189 of 3-methylarginine (1); B) LC-ESI MS/MS of the $[M+H]^+$ 175 of arginine (2); and C) ^1H NMR spectrum (500 MHz, MeOD, 300 K) of 1.

3-methylarginine (1) with both the D-amino acid oxidase^[14] from porcine kidney and the L-amino acid oxidase^[13] from *Crotalus atrox* yielded only the expected oxo acid 7 with the L-specific amino oxidase. Therefore, the amino group of 1 appears to be L configured.

Notably, the *syn*- and *anti*-isomers of the pentafluorobenzylhydroxyloxime derivatives of 7, which were used for the sensitive LC-MS detection of 7, exhibited strong differences in the peak intensities of their ESI-MS/MS spectra. The separation of the *syn*- and *anti*-isomers of the pentafluorobenzylhydroxyloximes of 7 was more pronounced than that of the corresponding pentafluorobenzylhydroxyloximes derived from the transamination of arginine (2; see the Supporting Information). The latter effect can be attributed to the 3-methyl group of 1.

Biosynthesis of 3-methylarginine

Regarding the biosynthesis of 3-methylarginine (1), we focused on the origin of the 3-methyl group, as it is responsible for the toxic effect of 1. The methyl group of 1 might stem from a small-molecule precursor that undergoes condensation with another precursor molecule to form 1. However, methyl

groups are often introduced into molecules by S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferases.^[15] The methyl transfer from S-adenosylmethionine can be mediated by either a nucleophilic attack to the protonated methyl group of SAM or a radical reaction mechanism.^[16] Alternatively, the methyl group of SAM could be used to methylate the cobalamin co-factor of a vitamin B12-dependent enzyme. In cobalamin-dependent enzymes, the methylcobalamin catalyzes the methyl group transfer.^[17]

In order to address the origin of the methyl group, we cultured Pss22d in the presence of labeled $[^2\text{H}_3\text{-CH}_3\text{-S-}]$ -methionine, the precursor of SAM (5). As the $[^2\text{H}_3]$ -methyl group was found to be incorporated into $[3\text{-}^2\text{H}_3]$ -3-methylarginine (1b) in high yields (95%), there is no doubt that the methyl group of 3-methylarginine (1) originates from SAM. However, the feeding experiment did not clarify whether 5-amino-2-oxopentanoic acid (6) or 5-guanidino-2-oxopentanoic acid (7) serves as precursor for the introduction of the methyl group into 1. Moreover, this feeding experiment did not address any mechanistic details of the methyl group transfer.

Random Tn5 transposon mutagenesis was used to identify the methyltransferase gene of Pss22d that catalyzes the methyl group transfer in 3-methylarginine biosynthesis. One of the obtained mutants, Pss22d.1 (Table 1), was identified as a SAM-dependent methyltransferase mutant by sequencing the flanking regions of the miniTn5 insertion. We analyzed the supernatant of mutant Pss22d.1 that was grown in the presence of spectinomycin as a selection marker and detected no trace of 1 in the LC-MS analysis (Figure 4). As a control, to see whether spectinomycin itself might affect 3-methylarginine formation, two nonmethyltransferase Tn5 mutants (Pss22d.2, Pss22d.3) were analyzed; these were also grown in the presence of spectinomycin, and both produced 1, as did the wild type.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains	Relevant characteristics ^[a]	Source
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>		
Pss22d	wild type from soybean	[5]
Pss22d.1	transposon mutant, 3-methyl-arginine negative, Sp ^r	this study
Pss22d.2	transposon mutant, 3-methyl-arginine positive, Sp ^r	this study
Pss22d.3	transposon mutant, 3-methyl-arginine positive, Sp ^r	this study
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>		
Psg1a	wild type from soybean	[6]
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>recA lacZΔM15</i>	[34]
S17λpir	<i>recA, thi, pro, hsdR-M+</i> , RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7, λpir, Tp ^r , Sm ^r	[35]
Plasmids		
pCAM-Not	Sp ^r , Amp ^r , mTn5S540 transposon, pUT/mini-Tn5 Sm/Sp	[35]
pBBR1 MSC	cloning vector, broad host range, IncP IncQ, Cm ^r	[36]

[a] Cm^r, Sp^r, Km^r, Amp^r, Tp^r, Sm^r resistance to chloramphenicol, spectinomycin, kanamycin, ampicillin, trimethoprim, streptomycin, respectively.

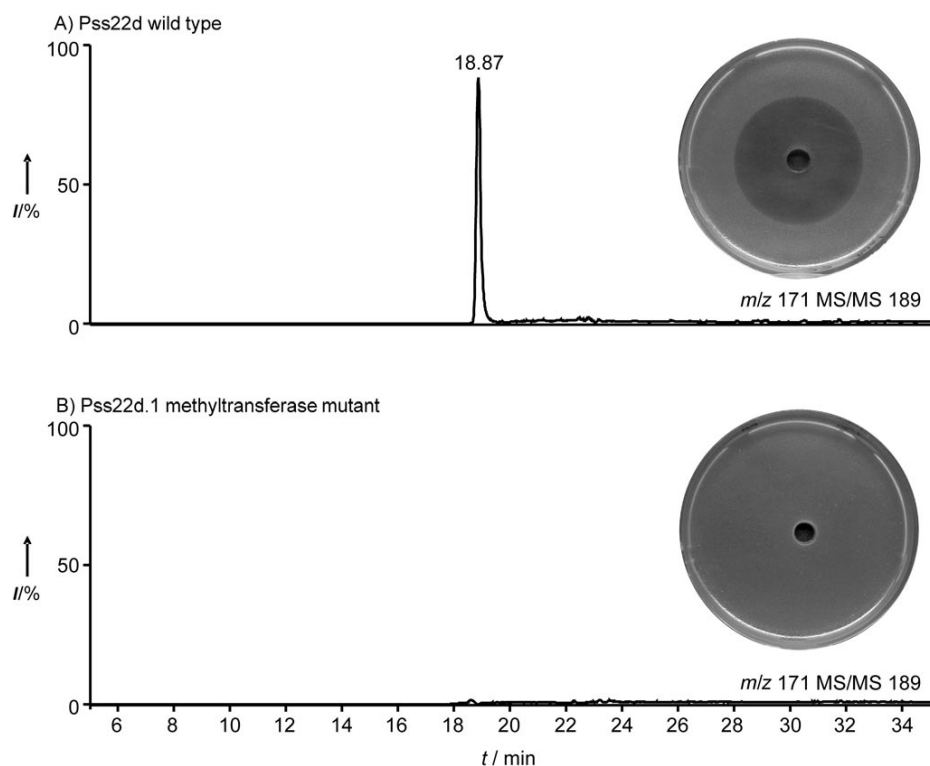


Figure 4. A) Wild-type Pss22d and B) SAM-methyltransferase mutant Pss22d.1. The ESI-MS/MS traces [$M+H-18$] $^{+}$ m/z 171 of 3-methylarginine (**1**) together with the agar-diffusion assays against Psg are shown (HPLC: HILIC conditions, Phenomenex Luna NH₂).

As the test organism, Psg, is sensitive to spectinomycin for the agar-diffusion assay, the mutant Pss22d.1 had to be cultured without spectinomycin in order to assess the supernatant of the mutant Pss22d.1 in the bioassay (see the Supporting Information). No growth inhibition of Psg by the mutant extract was observed in this bioassay (Figure 4B).

The obtained sequence for Pss22d was 95% identical to the hypothetical protein YP_233230 (putative methyltransferase) of the fully sequenced strain *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (PssB728a does not produce **1**).^[18] In order to distinguish between a SAM-dependent, a radical SAM-dependent, or a cobalamin-dependent methyl transfer mechanism, the conserved domains of the putative methyltransferase protein of Pss22d were compared to representatives of each class (Figure 5).

Methyltransferases share characteristic sequence motifs that allow them to be classified together. For example, motif 1 (DXGXGXG) is characteristic for a SAM binding site.^[19] For radical SAM methyltransferases, a CXXXCXXC motif that is crucial for Fe–S cluster binding and a SAM-binding site DXHXXG motif (motif 1) are typical. Cobalamin-dependent enzymes have motif 1 but also comprise motif 2 (DXXGXS...GG), which is involved in cobalamin binding.^[20]

The methyltransferase of Pss22d comprises a SAM-binding site (motif I) but is missing the characteristic motifs of radical SAM enzymes as well as those of cobalamin-dependent enzymes (motif 1 and 2, Figure 5). Also no Fe–S cluster binding

site (CXXCXXC) motif was found in the sequence of the Pss22d methyltransferase (unpublished results). Protein BLAST search analysis revealed a conserved domain similar to that of methyltransferases type 12^[21] (InterPro: IPR013217), the members of which are known to catalyze O-, N-, and C-methylation and have a Rossmann-like α/β fold in common.

In their recent study, Mahler et al. investigated a SAM-dependent methylation mechanism similar to that of 3-methylarginine biosynthesis by Pss22d. Their methyltransferases (GlmT, DptI, LptI) convert α -ketoglutarate to 3-methylglutamate, which is part of acidic lipopeptides, such as calcium-dependent antibiotic (CDA), daptomycin, and A54145.^[22,23] The SAM-dependent methyltransferases of 3-methylglutamate biosynthesis, however, show similarity to the ubiquinone methyltransferase (UbiE).^[22] The results of the comparison of the conserved domains of type 12 SAM methyltransferases and UbiE SAM methyltransferase indicate that motif I but not motifs II and III are conserved between both types (Figure 5). These differences may also suggest some differences in the catalytic mechanism.

Given the protein sequence alignment, we suggest the following mechanism for the formation of 3-methylarginine by the methyltransferase from Pss22d (Scheme 1).

The electrophilic protonated methyl thioether of SAM (**5**) is attacked by a nucleophilic enol of a 2-oxo acid precursor (**3** or **4**); this yields the 3-methyl-2-oxo-acid **6** or **7**. Subsequently, the 3-methyl-2-oxo-acid **6** or **7** is converted to 3-methyl-2-amino acid **8** or **1** by a transaminase. Furthermore, radical methylation mechanisms are usually only favored to perform reactions at non-nucleophilic sites of the target molecule. Clearly, the ease of the formation of a nucleophilic enol **3** or **4** that is prone to react with the electrophilic protonated methyl group of SAM favors the suggested mechanism over a radical that requires a more elaborate catalytic mechanism.^[16]

Ecological role of 3-methylarginine and suggested mode of action

3-Methylarginine (**1**) from Pss22d constitutes a powerful and selective toxin against Psg, and approximately 20 nmol of **1** cause a 33 mm inhibition zone in the agar-diffusion assay against Psg (Figure 4A). Thus it is likely that the epiphytic

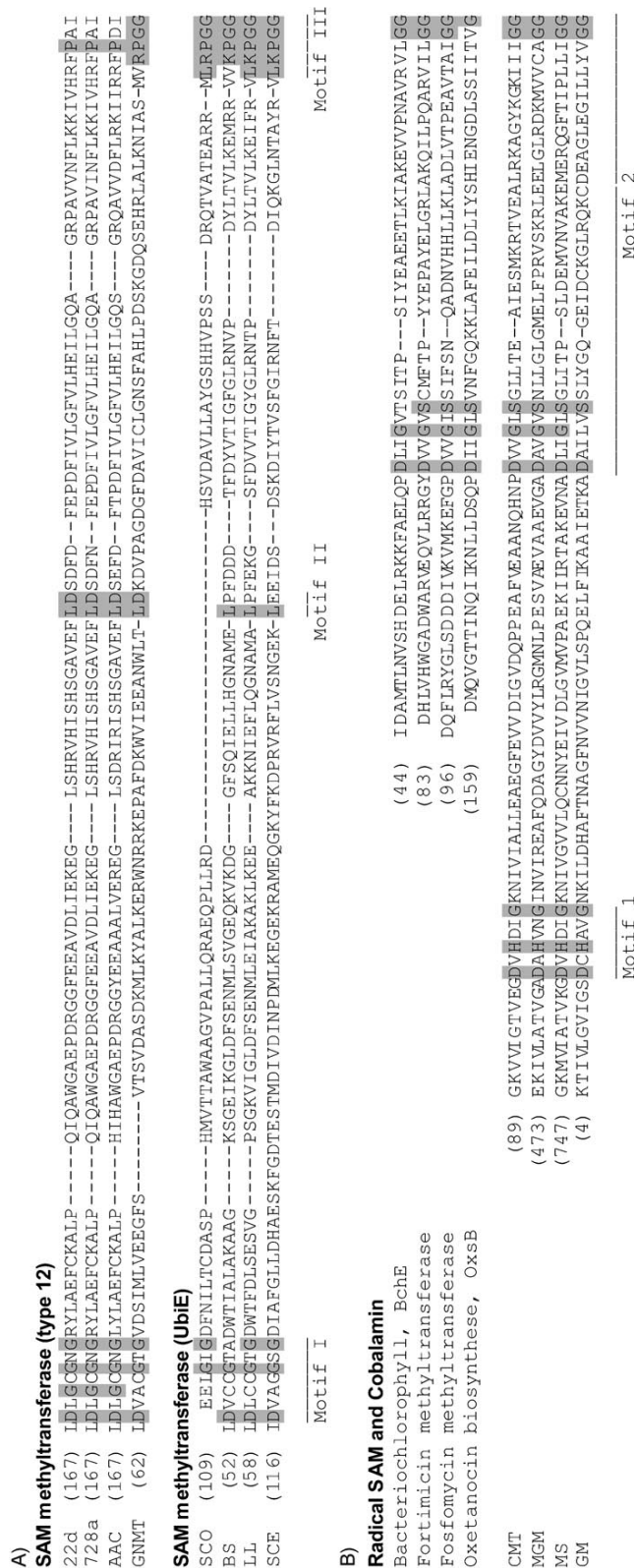
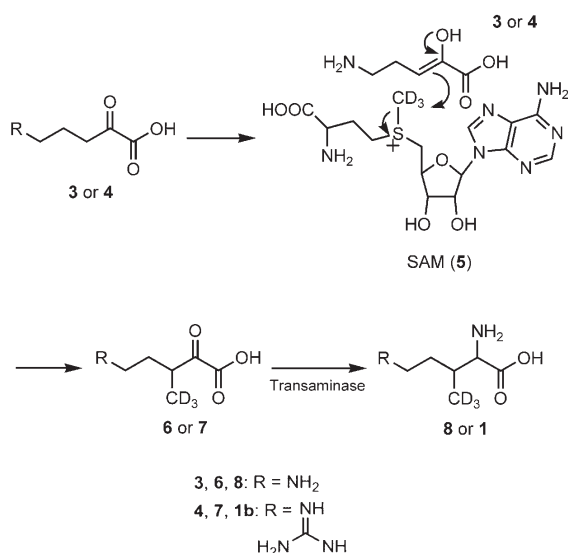


Figure 5. A) Multiple protein sequence alignment of SAM-dependent methyltransferases. The alignment of the N terminus of type 12 and UbiE methyltransferases illustrates that motif I but not motifs II and III are highly conserved between these two groups. The type 12 SAM methyltransferase proteins are 22d (*P. syringae* pv. *syringae* 22d/93, putative methyltransferase, this study), B728a (*P. syringae* pv. *syringae* B728a, hypothetical protein, Gi: 66043389), AAC (*Acidovorax avenae* subsp. *citricola*, methyltransferase type 12, Gi: 120612348), GNM1 (*Ratus norvegicus*, glycine N-methyltransferase, Gi: 8567354). The UbiE SAM methyltransferases are SCO²²¹ (*Streptomyces coelicolor*, hypothetical protein SCO3215, Gi: 21221650), BS (*Bacillus subtilis*, menaquinone biosynthesis methyltransferase UbiE, Gi: 399775), LL (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, menaquinone biosynthesis methyltransferase UbiE, Gi: 1346175), SCE (*Saccharomyces cerevisiae*, ubiquinone biosynthesis methyltransferase COQ5, Gi: 1353083). B) Multiple protein sequence alignment of the N terminus of radical SAM and cobalamin-dependent methyltransferases show the highly conserved motifs 1 and 2, which are not present in type 12 and UbiE SAM methyltransferases. The radical SAM methyltransferases and cobalamin-dependent proteins are the bacteriochlorophyll biosynthesis protein BchE (Gi: 114858), a fortimycin methyltransferase (Gi: 1125024), a fosfomycin methyltransferase (Gi: 2144248), the oxetanocin biosynthesis protein OxsB (Gi: 7474372), CMT (corrinoid methyltransferase, Gi: 7483270), MGM (2-methyleneglutarate transferase, Gi: 543481), MS (methionine synthase, Gi: 40024), GM (glutamate synthase, Gi: 7245512).

Pss22d benefits from the toxin 1 in its natural habitat and gains a competitive advantage against the closely related plant pathogen Psg, which lives in the same environment. Consequently, since 1 functions ecologically as a toxin makes it an attractive biocontrol agent to protect soybean against bacterial blight.

Although the mode of action of 3-methylarginine (1) against the plant pathogen Psg remains to be established, the structure of the toxin provokes several hypothetical scenarios. The incorporation of 1 instead of L-arginine (2) into proteins might seriously affect their function and result in metabolic defects and finally lead to cell death. However, the rather low amount of 1 produced by Pss22d could point instead to its function as an enzyme inhibitor. As arginine analogues act as potent inhibitors of nitric oxide synthase (NOS),^[24] it could be that 1 interferes with this enzyme. NOS is common among most animals, plants, and bacteria,^[25] it uses L-arginine to generate nitric oxide (NO), which plays an important role as a signal in plant defense, and it might influence the virulence of pathogens and contribute to OxyR-mediated antioxidant defense.^[26] Furthermore, hypothetical NOS genes are annotated for some *P. syringae* pathovars: for example, there are two genes in the genome of the fully sequenced strain *P. syringae* pv. *syringae* B728a.^[18] Alternatively, 1 might competitively inhibit an enzyme of the arginine biosynthesis pathway in Psg. Inhibition of the plant pathogen Psg is reversed by 2, but not by other precursors of arginine biosynthesis. Therefore, we suspect argininosuccinate lyase, which cleaves L-argininosuccinate to 2 and fumarate, to be a possible target enzyme of 1. A similar mechanism is well known from phaseolotoxin produced by *P. syringae* pv. *phaseolicola*; this inhibits the ornithine carbamoyl transferase (OCTase).^[8] Recently, Arrebola et al.^[27] demonstrated that *P. syringae* pv. *syringae* strains isolated from mango trees produce a novel antimetabolite toxin named mangotoxin. It inhibits ornithine acetyltransferase—a key enzyme in the syn-



Scheme 1. Suggested biosynthesis of [3-²H₃]-3-methylarginine (**1b**) deduced from administration of [²H₃-CH₂-S]-methionine to the growth medium and the protein sequence alignment (Figure 5).

thesis of ornithine and arginine. Even though mangotoxin is not structurally related to **1**, it is interesting that both compounds seem to target arginine biosynthesis.

Conclusions

In summary, we have established the structure of the toxin from Pss22d to be the rare nonproteinogenic amino acid 3-methylarginine (**1**), which is highly active against the closely related plant pathogen Psg. The key step in its biosynthesis is the introduction of a 3-methyl group—very likely into a 2-oxo acid precursor—by the action of a SAM-dependent methyltransferase, which has been identified by transposon mutagenesis. Strikingly, the small modification of the additional methyl group, in comparison to the proteinogenic amino acid arginine (**2**), turns **1** into a potent and selective toxin against Psg.

Future experiments are needed to fully characterize the biosynthetic genes. The enzymes involved in 3-methyl amino acid biosynthesis are also attractive for the biotechnological production of 3-methyl amino acids, because such amino acids are not easily accessible in an enantiopure form by synthetic approaches.^[26] The identification of 3-methylarginine (**1**) now allows further detailed studies of the chemoecological role of this toxin for the epiphyte Pss22d and its habitat to be carried out. Moreover, its potential as a biocontrol substance against the plant pathogen Psg can be evaluated in detail.

Experimental Section

General: ESI-MS measurements were performed by using a Thermo-electron LTQ or LCQ hooked to a HP-1100 HPLC that was fitted with a Phenomenex Synergy polar RP (250 mm × 2 mm, 4 μm) column, Phenomenex Luna NH₂ (250 mm × 2 mm, 5 μm) column, or an Alltech Grom-Sil ODS-7 PH (125 mm × 2 mm, 4 μm) column. Al-

ternatively, the HPLC system was hooked to a Gilson 206 fraction collector in order to collect pure samples for NMR spectroscopy analysis. HR-ESI-MS measurements were conducted by direct insertion of the purified sample via a syringe pump by using a Thermo-electron Orbitrap; NMR spectroscopy was performed with a Bruker DRX 500 MHz NMR spectrometer. The chemical shifts of ¹H NMR and ¹³C spectra are given in ppm (δ) and were referenced to the solvent signal CD₃OD 3.31 and 49.00 ppm, respectively.

Strains and culture conditions: The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *P. syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d) wild type was previously isolated from soybean leaves.^[5] Pss22d, the mutants of Pss22d, and the indicator strain *P. syringae* pv. *glycinea* 1a/96 (Psg1a) were cultured and maintained on King's B^[28] agar plates at 28 °C. Cultures of Pss22d and its mutants were cultured in 1 L HSC (Hoitink-Sinden medium optimized for coronatine production) liquid medium^[29] on a shaker with 200 rpm at 28 °C for 48 h. Then spectinomycin (25 μg mL⁻¹) was added to the medium of the mutants. *E. coli* DH5α were cultured on Standard 1 (Merck) agar plates and used for DNA manipulation.

Growth curve, physical, and chemical characteristics: In order to optimize the toxin production of Pss22d, different media (HSC,^[29] 5b,^[30] Pipes^[31]) and temperatures (18, 28 °C) were tested. The growth curve of Pss22d was determined in three parallel experiments by using a Pss22d culture grown in HSC (100 mL) medium that was shaken (200 rpm, 28 °C) for 72 h. From an overnight pre-culture, the main cultures were inoculated with approximately 7 × 10⁷ cfu mL⁻¹. Every 6 h samples were withdrawn and absorbance at 578 nm was measured (Amersham Bioscience, Ultraspec 2100 pro). The toxic activity of each sample was determined by agar-diffusion assay (see below). Physical parameters of the toxin were assessed by using a cell-free filtrate from Pss22d (heat stability at 65, 80, 100, and 121 °C for 15 min, and at 100 °C for 60 min; pH stability at pH 3, 9, and 12 for 15 min, and then readjusted to the original pH 6).

Agar-diffusion assay: Pss22d, its mutants, and all fractions of the purification were screened for toxin activity by using agar-diffusion assays with Psg1a as indicator strain. Psg1a was cultured on King's B agar plates, overnight, at 28 °C. Single colonies of Psg1a were scraped from the plate and resuspended in sterile water. A sample of this suspension (2 mL, about 4 × 10⁸ cfu mL⁻¹) was added to 50 mL of melted 5b agar medium (50 °C) and poured onto plates (130 mm); samples (50 μL) were added into wells (9 mm) in the agar plates. The plates were incubated at 28 °C and analyzed after 24 h. To determine the relative toxin concentration, a standard curve was prepared by using the culture filtrate after the ion-exchange purification step (Supporting Information).

Isolation and identification of 3-methylarginine (1**):** Preliminary experiments with anion- and cation-exchange resins and different potassium buffers indicated that the best binding activity was on a cation exchange matrix (CM-Sephadex C-25) with HPLC water (pH 8.0). In order to remove hydrophobic substances from the crude extract it was extracted with ethyl acetate. The subsequent agar-diffusion assay indicated the presence of toxic activity in the water phase. The toxin extract was freeze-dried. Despite the hydrophilic properties of the toxin, it was easily soluble in methanol (recovery about 90% of toxic activity). The methanol phase was concentrated in vacuo and resuspended in water. These samples were directly applied onto a CM-Sephadex column (GE Healthcare Tricorn™, diameter 10 cm, length 300 cm). Preliminary gradient analysis on CM-Sephadex column resulted in a stringent elution of the toxin at 0.3 M ammonium hydrogen carbonate (pH 7.8). To simplify

the purification, HPLC water and ammonium hydrogen carbonate (0.2 M, pH 7.8) were used for loading and washing, respectively. A 0.3 M ammonium hydrogen carbonate solution served for elution and a 1.0 M ammonium hydrogen carbonate solution (pH 7.9) was used to clean the column. Active fractions were pooled and concentrated in vacuo. Further purification was performed by using HPLC separation (Phenomenex Synergy polar RP column); flow rate 0.25 mL min⁻¹, solvent A: H₂O, 0.1% TFA; solvent B: MeCN, 0.1% TFA; gradient: 5 min 100% A, in 27 min to 100% B, 100% B 5 min; injection volume 10–100 µL. Alternatively, samples were assayed by using a Phenomenex Luna NH₂ under HILIC conditions (solvent A: H₂O, 0.1% AcOH; B MeCN, 0.1% AcOH; gradient: 3 min 100% B, in 27 min 100% A, 100% A 5 min, injection volume 10–100 µL).

3-Methylarginine (1): t_R = 3.7 min (Phenomenex polar RP); t_R = 18.9 min (HILIC Phenomenex Luna NH₂); ESI-MS: $[M+H]^+$ 189 (100); HR-ESI-MS: C₇H₁₇N₄O₂ found 189.1344, calcd 189.1345; ESI-MS/MS of 189: 189.1344 (9), 172 (25), 171.1239 (100, C₇H₁₅ON₄), 154 (4), 144.1130 (12, C₆H₁₄ON₃), 130.0861 (35, C₆H₁₂O₂N), 84.0807 (6, C₅H₁₀N), 60.0557 (18, C₄H₈N₃); ¹H NMR (500 MHz, MeOD, 300 K): δ = 1.09 (d, J = 7.1, 3H, CH₃), 1.53–1.63 (m, 1H, C4), 1.81–1.91 (m, 1H, C4), 2.27–2.37 (m, 1H, C3), 3.21–3.37 (m, 2H, C5), 3.93 (d, J = 3.7, 1H, C2); APT-NMR (125 MHz, MeOD, 300 K): δ = 14.70 (CH₃, C7), 32.58 (CH₂, C4), 32.96 (CH, C3), 40.12 (CH₂-N, C5), 58.62 (CH-NH₂, C2), 158.79 (C=NH, C6), 171.67 (C=O, C1).

Arginine (2): ESI-MS: $[M+H]^+$ 175 (100); ESI-MS/MS of 175: 175 (23), 158 (100), 157 (73), 130 (37), 116 (51), 70 (7), 60 (41).

Feeding of [²H₃]-L-methionine: [²H₃]-L-methionine (1 mg) was added to HSC liquid medium (100 mL) with a cell density of approximately 7 × 10⁷ cfu mL⁻¹ of Pss22d. After 48 h at 28 °C, the culture was harvested and the samples were worked-up by ion-exchange chromatography as described above. The incorporation of the label into 3-methylarginine (1) was monitored by LC-ESI-MS/MS analysis.

[²H₃]-3-Methylarginine (1b): t_R = 3.7 min; ESI-MS: $[M+H]^+$ 192 (100); ESI-MS/MS of 192: 192 (8), 175 (27), 174 (100), 157 (4), 147 (14), 133 (37), 87 (6), 60 (17).

Tn5 mutagenesis: Transposon mutagenesis of Pss22d was carried out by mating experiments on Standard 1 agar at 28 °C, overnight, by using *E. coli* S17λpir containing the plasmid pCAM-Not with the Tn5 minitransposon mTn5S540 as donor strain (Table 1). Derivative Pss22d mutants were isolated on MG medium^[32] with spectinomycin (25 µg L⁻¹) as selection agent. Toxin negative Pss22d mutants were analyzed by shotgun sequencing. Briefly, isolated genomic DNA of toxin negative Pss22d mutants and the cloning vector pBBR1MCS were digested, overnight, with Sall and then ligated by using T4 DNA ligase (Fermentas EL0015). Derived plasmids were transformed by electroporation into *E. coli* DH5α. Transformed *E. coli* cells were screened on selective standard 1 medium containing spectinomycin for antibiotic selection. The primer "miniTn5-out" (5'-CTCACAGCCAACTATCAGG-3') was used for sequence analysis of the region that flanked the miniTn5 insertions. For the alignment the program DNASTar Megalign was used. Conserved domains were analyzed by using the protein BLAST search engine of NCBI.^[21]

LC-ESI-MS/MS analysis of the mutants Pss22d.1, Pss22d.2, Pss22d.3, and the wild-type Pss22d was performed by using a 100 mL culture. For the mutants two cultures were analyzed. The first culture, which was without spectinomycin, was used to evaluate toxin activity in the agar-diffusion assay. The second culture contained

spectinomycin (25 µg L⁻¹) as a selective agent and was used for the LC-MS analysis of the mutant's 3-methylarginine (1) content. To quantify 1 production by the mutants and wild-type, L-arginine (5 µg mL⁻¹, 2), which is not present in the Pss22d culture medium was added to the supernatant before the sample was worked-up as internal standard. After ion-exchange chromatography (see above), the samples were injected into the LC-MS system. Wild-type samples were worked-up, assayed, and analyzed in the same way as the samples of mutants.

Stereochemistry of 3-methylarginine (1): 3-Methylarginine (ca. 100 µg) was added to either D-amino acid oxidase (3 units) from porcine kidney (Sigma A5222) and catalase from bovine liver (2950 units; Sigma C1345) in Tris buffer (300 µL, 30 mM, pH 8.3), or to L-amino acid oxidase type VI (0.2 units) from *Crotalus atrox* (Sigma A5147) in Tris buffer (pH 6.7, 30 mM). The mixtures were incubated at 37 °C for 1 h. The enzymes were precipitated by being vortexed for 2 min after the addition of HCl (6 N, 50 µL) and CH₂Cl₂ (500 µL). After centrifugation, the H₂O layer was collected, dried in an argon stream and redissolved in methanol (500 µL). After derivatization with pentafluorobenzylhydroxylamine hydrochloride (200 µg; 37 °C, 1 h) the samples were analyzed by LC-MS/MS.^[33] As controls L- and D-arginine were each subjected to both amino acid oxidases and analyzed in the same way as 1. HPLC column: Grom-Sil ODS-7 PH (125 mm × 2 mm, 4 µm) HPLC program: 3 min 0% B, in 27 min 100% B, 10 min 100% B; A: H₂O, 0.5% AcOH; B: MeCN, 0.5% AcOH; flow rate 0.2 mL min⁻¹.

Pentafluorobenzylxime of 2-oxo-3-methylarginine (7): t_R = 16.6 and 16.9 min (syn- and anti-isomers, respectively); ESI-MS: $[M+H]^+$ 383; HR-ESI-MS: C₁₄H₁₆O₃N₄F₅ found 383.11368, calcd 383.11371; ESI-MS/MS of 383 at 17.7 min: 339 (4), 141 (100), 126 (1), 124 (9); ESI-MS/MS of 383 at 18.4 min: 339 (100), 141 (11), 126 (18), 124 (1).

Acknowledgements

S.D.B. and B.V. are grateful for financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FO 558/6-3) and further, we thank Prof. Erika Kothe and colleagues for their generous support. D.S. thanks Prof. Wilhelm Boland for his generous support and the Deutsche Forschungsgemeinschaft for funding by the Emmy Noether programme (SP110631) as well as the Verband der Chemischen Industrie and the Max Planck Society for financial support.

Keywords: biosynthesis • methylarginine • methyltransferase • natural products • *Pseudomonas syringae*

- [1] D. Haas, G. Defago, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 307–319; J. M. Raaijmakers, M. Vlam, J. T. de Souza, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2002**, 81, 537–547; V. Ramamoorthy, R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, R. Samiyappan, *Crop Prot.* **2001**, 20, 1–11; X. L. Zhuang, J. Chen, H. Shim, Z. H. Bai, *Environ. Int.* **2007**, 33, 406–413.
- [2] T. F. C. Chin-A-Woeng, G. V. Bloemberg, B. J. J. Lugtenberg, *New Phytol.* **2003**, 157, 503–523; D. N. Dowling, F. Ogara, *Trends Biotechnol.* **1994**, 12, 133–141; T. Leisinger, R. Margraff, *Microbiol. Rev.* **1979**, 43, 422–442.
- [3] S. S. Hirano, C. D. Upper, *Annu. Rev. Phytopathol.* **1990**, 28, 155–177.
- [4] C. E. Morris, L. L. Kinkel, K. Xiao, P. Prior, D. C. Sands, *Infect. Genet. Evol.* **2007**, 7, 84–92; V. O. Stockwell, R. J. McLaughlin, M. D. Henkels, J. E. Loper, D. Sugar, R. G. Roberts, *Phytopathology* **1999**, 89, 1162–1168.
- [5] B. Völksch, J. Nüske, R. May, *J. Basic Microbiol.* **1996**, 36, 453–462.
- [6] R. May, B. Völksch, G. Kampmann, *Microb. Ecol.* **1997**, 34, 118–124; B. Völksch, R. May, *Microb. Ecol.* **2001**, 41, 132–139.

- [7] A. Wensing, PhD Thesis, International University of Bremen **2006**.
- [8] C. L. Bender, F. Alarcon-Chaidez, D. C. Gross, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 266–292.
- [9] V. Fogliano, A. Ballio, M. Gallo, S. Woo, F. Scala, M. Lorito, *Mol. Plant–Microbe Interact.* **2002**, *15*, 323–333.
- [10] A. L. Demain, *Int. Microbiol.* **1998**, *1*, 259–264; E. L. Gaden, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 629–635.
- [11] J. Nüske, F. Bublit, *J. Basic Microbiol.* **1993**, *33*, 241–246.
- [12] I. Uchida, N. Shigematsu, M. Ezaki, M. Hashimoto, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 3053–3056.
- [13] X. Y. Du, K. J. Clemetson, *Toxicon* **2002**, *40*, 659–665.
- [14] R. Miura, C. Setoyama, Y. Nishina, K. Shiga, I. Miyahara, H. Mizutani, K. Hirotsu, *J. Mol. Catal. B* **2001**, *12*, 43–52.
- [15] O. S. Fatoki, *S. Afr. J. Sci.* **1997**, *93*, 366–370.
- [16] P. A. Frey, A. D. Hegeman, F. J. Ruzicka, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *43*, 63–88.
- [17] R. G. Matthews, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 681–689.
- [18] H. Feil, W. S. Feil, P. Chain, F. Larimer, G. DiBartolo, A. Copeland, A. Lykidis, S. Trong, M. Nolan, E. Goltsman, J. Thiel, S. Malfatti, J. E. Loper, A. Lapidus, J. C. Detter, M. Land, P. M. Richardson, N. C. Kyrpides, N. Ivanova, S. E. Lindow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11064–11069.
- [19] R. M. Kagan, S. Clarke, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *310*, 417–427; J. E. Katz, M. Dlakic, S. Clarke, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 525–540.
- [20] H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, N. E. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1097–1106.
- [21] A. Marchler-Bauer, S. H. Bryant, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W327–331.
- [22] C. Mahler, F. Kopp, J. Thirlway, J. Micklefield, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12011–12018.
- [23] C. Milne, A. Powell, J. Jim, M. Al Nakeeb, C. P. Smith, J. Micklefield, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11250–11259.
- [24] D. Fishlock, B. Perdicakis, H. J. Montgomery, J. G. Guillemette, E. Jervis, G. A. Lajoie, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 869–873; R. Ijuin, N. Umezawa, S. Nagai, T. Higuchi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2881–2885.
- [25] J. A. Kers, M. J. Wach, S. B. Krasnoff, J. Widom, K. D. Cameron, R. A. Bukhalid, D. M. Gibson, B. R. Crane, R. Loria, *Nature* **2004**, *429*, 79–82.
- [26] L. A. J. Mur, T. L. W. Carver, E. Prats, *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 489–505.
- [27] E. Arrebola, F. M. Cazorla, V. E. Duran, E. Rivera, F. Olea, J. C. Codina, A. Perez-Garcia, A. de Vicente, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2003**, *63*, 117–127.
- [28] E. O. King, M. S. K. Ward, D. E. Raney, *J. Lab. Clin. Med.* **1954**, *44*, 301–307.
- [29] D. A. Palmer, C. L. Bender, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 1619–1626.
- [30] R. Guthke, J. Nüske, R. Schorcht, W. Fritsche, W. Knorre, *Z. Allg. Mikrobiol.* **1984**, *24*, 427–435.
- [31] B. Schwyn, J. B. Neilands, *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 47–56.
- [32] P. J. Keane, A. Kerr, P. B. New, *Aust. J. Biol. Sci.* **1970**, *23*, 585–590.
- [33] F. J. G. M. van Kuijk, D. W. Thomas, R. J. Stephens, E. A. Dratz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *139*, 144–149; F. Huang, D. Spiteller, N. A. Koobanally, Y. Y. Li, N. M. Llewellyn, J. B. Spencer, *ChemBiochem* **2007**, *8*, 283–288.
- [34] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557–580.
- [35] K. J. Wilson, A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, A. D. L. Akkermans, R. A. Jefferson, *Microbiology* **1995**, *141*, 1691–1705.
- [36] M. E. Kovach, R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. Roop, K. M. Peterson, *Bio-techniques* **1994**, *16*, 800–802.

Received: February 3, 2008
Published online on July 24, 2008

CHEMBIOCHEM

Supporting Information

for

3-Methylarginine from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93
Suppresses the Bacterial Blight Caused by Its Close Relative
Pseudomonas syringae pv. *glycinea*

Sascha D. Braun, Beate Völksch,* Jörg Nüske, Dieter Spiteller*

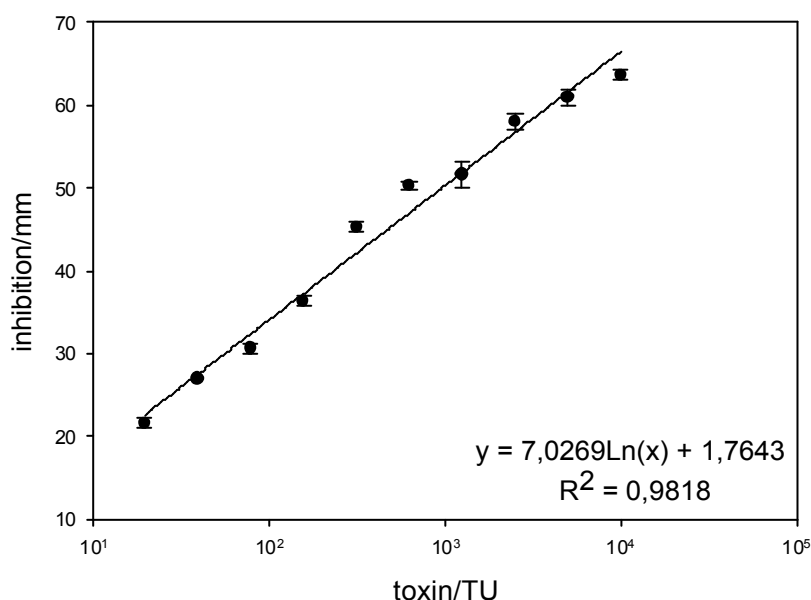
Table of contents

1	Purification of 3-methylarginine (1)	2
1.1	Standard curve of 3-methylarginine (1) toxicity	2
1.2	Ion exchange chromatography	3
1.3	HPL-chromatogram of purified 3-methylarginine (1)	3
2	Structure elucidation of 3-methylarginine (1)	4
2.1	ESI-MS of 3-methylarginine (1)	4
2.2	ESI-MS/MS of 3-methylarginine (1)	5
2.3	ESI-MS/MS of 3-arginine (2)	5
2.4	¹ H-NMR of 3-methylarginine (1)	5
2.5	H,H-COSY of 3-methylarginine (1)	6
2.6	APT-NMR spectrum of 3-methylarginine (1)	7
2.7	HSQC-NMR spectrum of 3-methylarginine (1)	8
3	Determination of the stereochemistry of 3-methylarginine (1)	9
3.1	TIC of MS/MS of [M+H] ⁺ 383, detection of 2-oxo-3-methylarginine (7) as pentafluorobenzyloxime derivative	9

3.2	MS/MS of $[M+H]^+$ 383 of the pentafluorobenzyloxime derivative of 2-oxo-3-methylarginine (7 , 17.66 min)	9
3.3	MS/MS of $[M+H]^+$ 383 of the pentafluorobenzyloxime derivative of 2-oxo-3-methylarginine (7 , 18.38 min)	10
4	Incorporation of $[^2H_3]$ -methionine into $[^2H_3]$ -3-methylarginine	10
4.1	$[^2H_3]$ -3-methylarginine (1b):3-methylarginine (1) ESI-MS/MS	10
4.2	ESI-MS/MS of the $[M+H]^+$ 192 of $[^2H_3]$ -3-methylarginine (1b)	11
5	Analysis of 3-methylarginine (1) production by the methyltransferase mutant in comparison to the wild-type	12
5.1	Comparison of 3-methylarginine (1) production of cultures grown in presence of spectinomycin	12
5.2	Comparison of 3-methylarginine (1) production of cultures grown without spectinomycin	12
5.3	Comparison of 3-methylarginine (1) production of different mutants	14

1 Purification of 3-methylarginine (**1**)

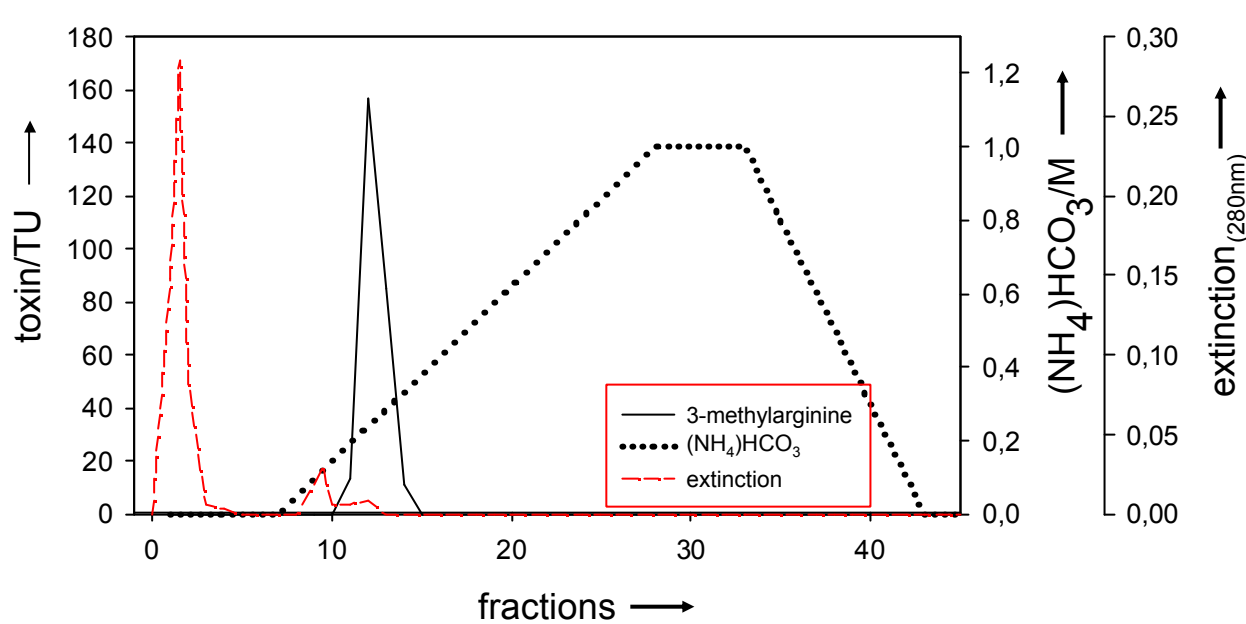
1.1 Standard curve of 3-methylarginine toxicity against Psg



A standard curve was established in order to determine the relative toxin concentration in all fractions of the different purification steps. Therefore a dilution series based on the highest toxin concentration of pooled 0.3 M ammonium hydrogen carbonate fractions collected after the ion exchange chromatography. The toxin concentration was determined by the standard agar diffusion assay (50 mL/well, see also experi-

mental section) and the inhibition zone was measured. The largest inhibition zone (64 mm) was equated to 10000 toxin units (TU). The progress of the toxin isolation by different purification steps was monitored using the described standard agar diffusion assay.

1.2 Ion exchange chromatography

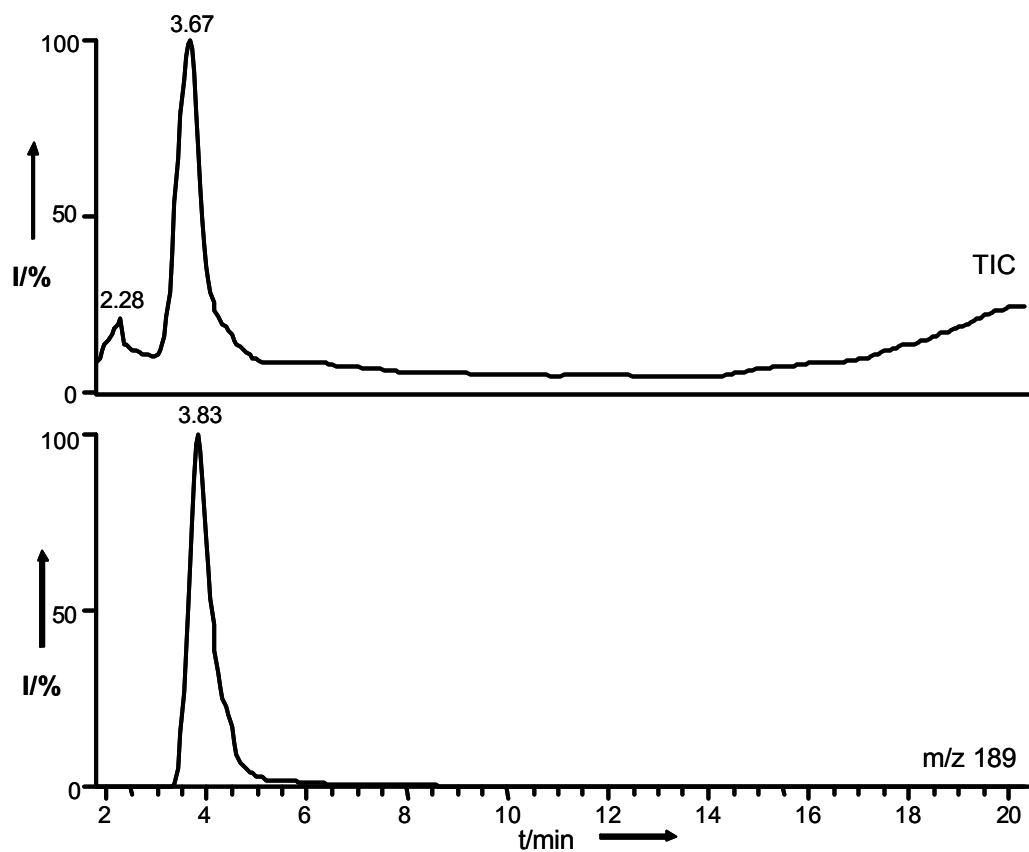


To determine at which ammonium hydrogen carbonate concentration the toxin (3-methylarginine (1)) eluted from the ion exchange column (CM Sephadex C25) a gradient analysis was performed. The highest toxin activity was found at fraction 12 with a very low extinction (0.009) and a concentration of 0.3 M ammonium hydrogen carbonate.

The observed elution behaviour of the toxin served as basis for the purification protocol: The toxin was purified by ion exchange chromatography using HPLC water and 0.2 M ammonium hydrogen carbonate for loading and washing, respectively. To elute the toxin from the column a 0.3 M ammonium hydrogen carbonate solution was used. A 1 M ammonium hydrogen carbonate solution served to clean the column.

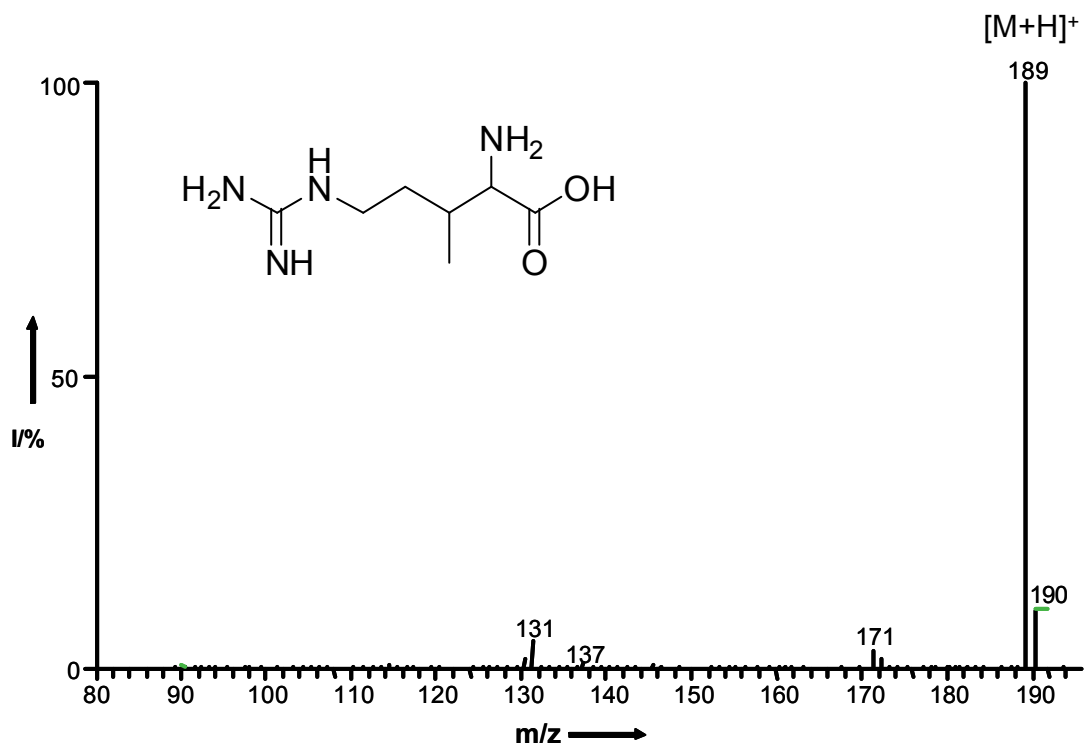
1.3 HPL-chromatogram of purified 3-methylarginine (1)

Phenomenex Synergy polar RP (150 mm x 2 mm, 4 μm), total ion current (above) and the ion trace of the [M+H]⁺ 189 (below)

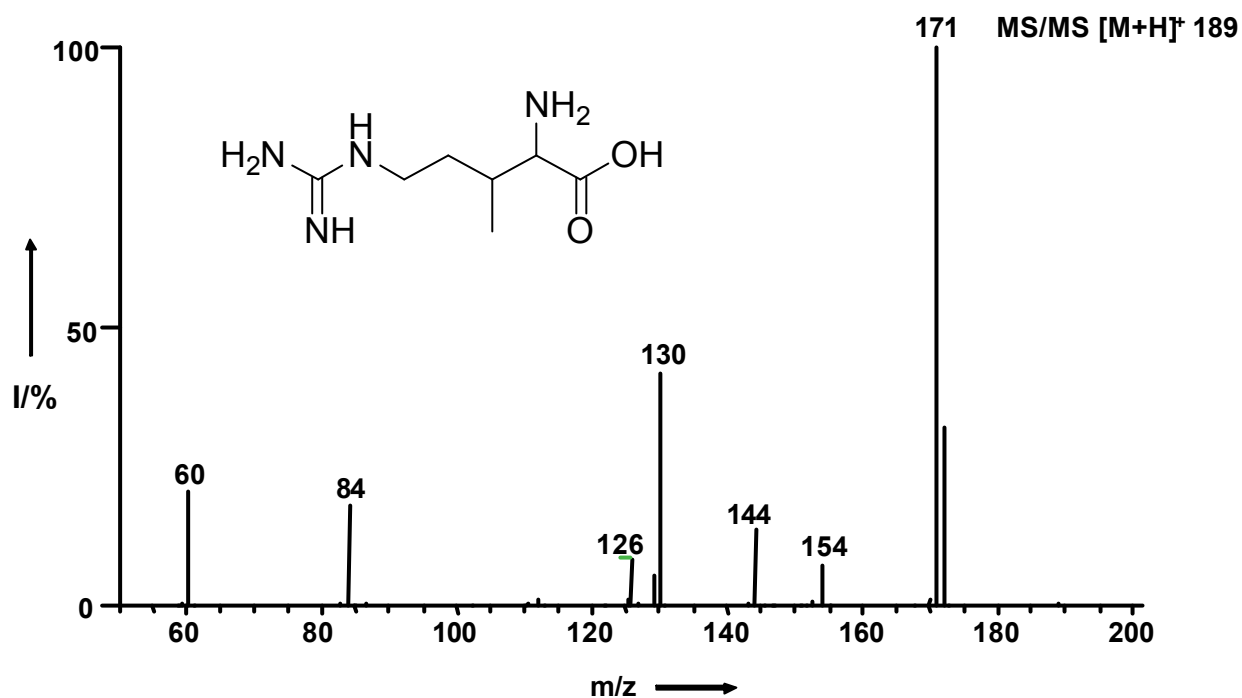


2 Structure elucidation of 3-methylarginine (1)

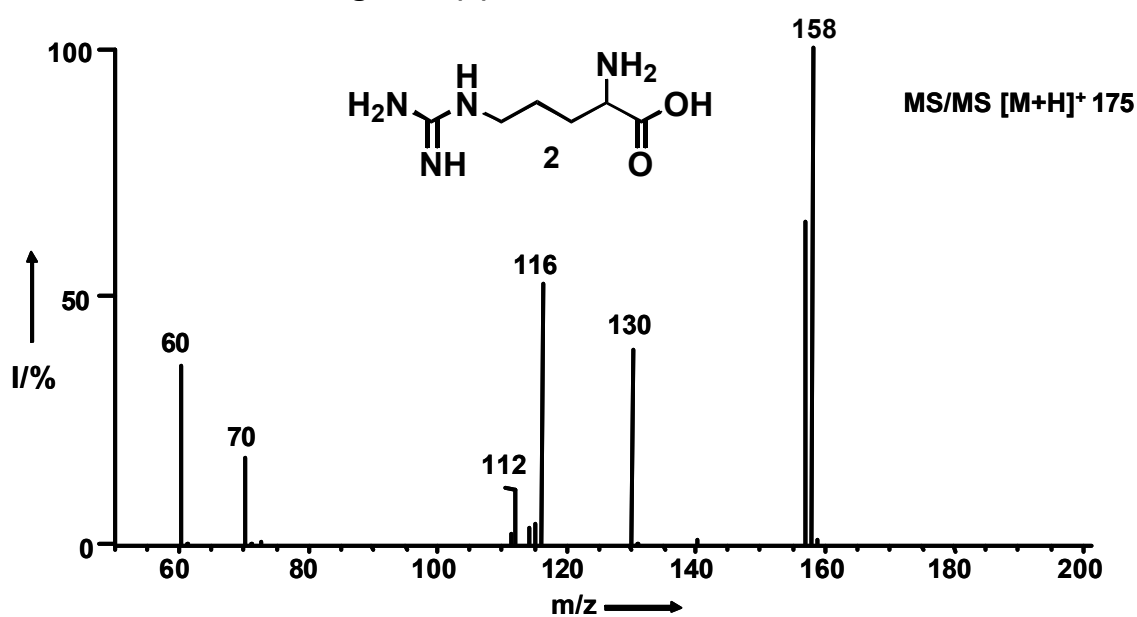
2.1 ESI-MS of 3-methylarginine (1)



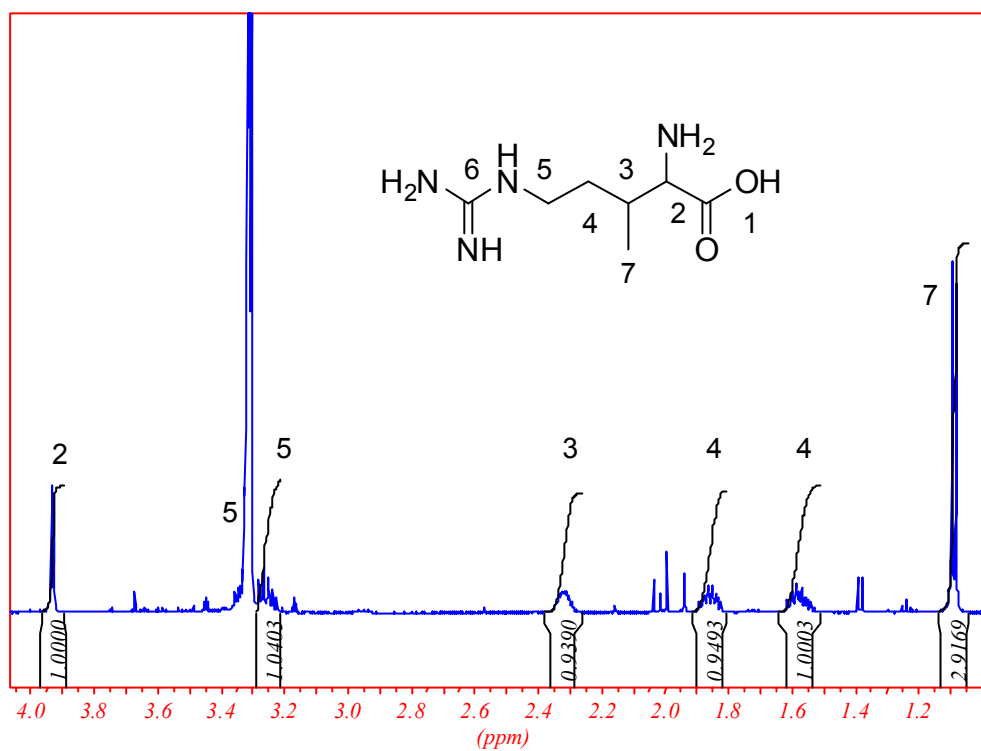
2.2 ESI-MS/MS of 3-methylarginine (1)



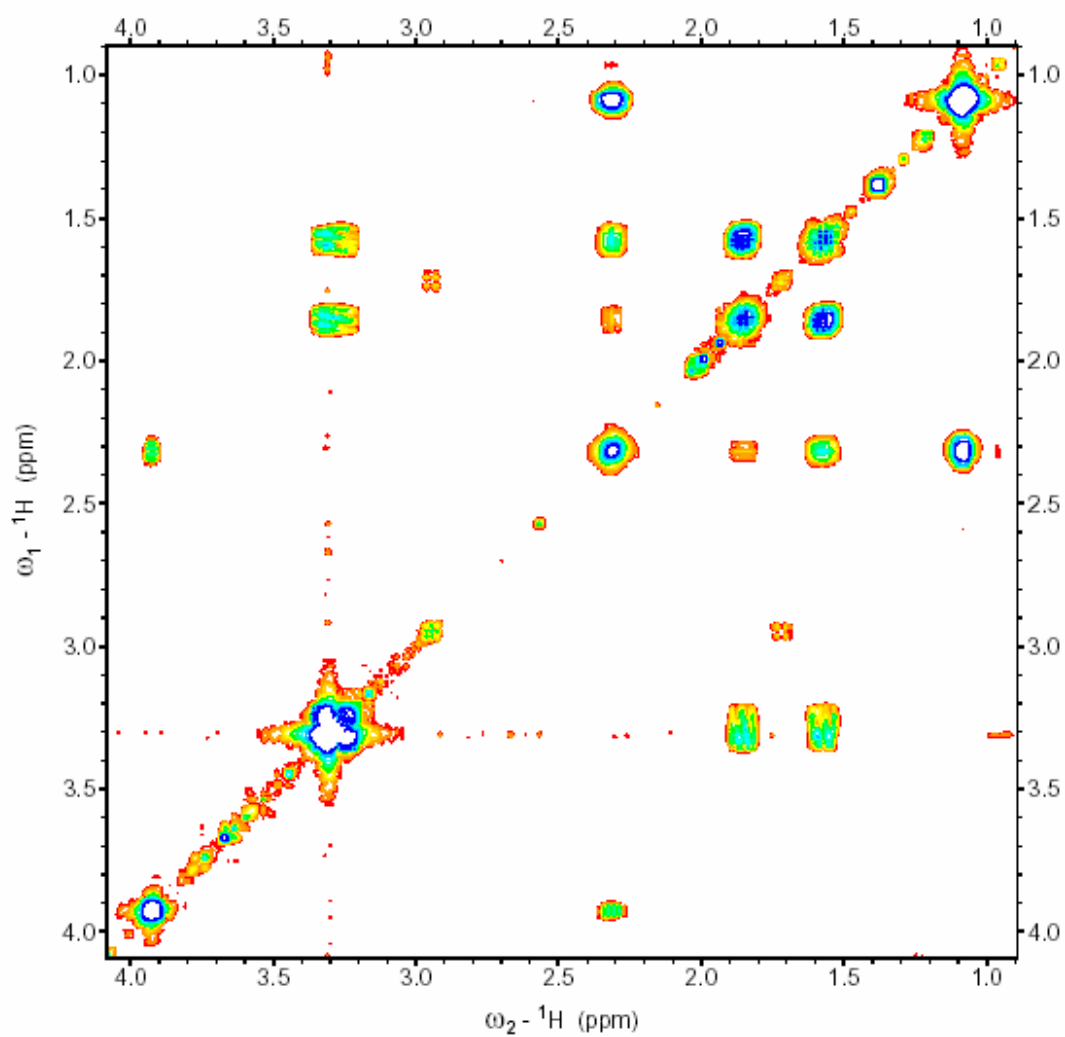
2.3 ESI-MS/MS of 3-arginine (2)



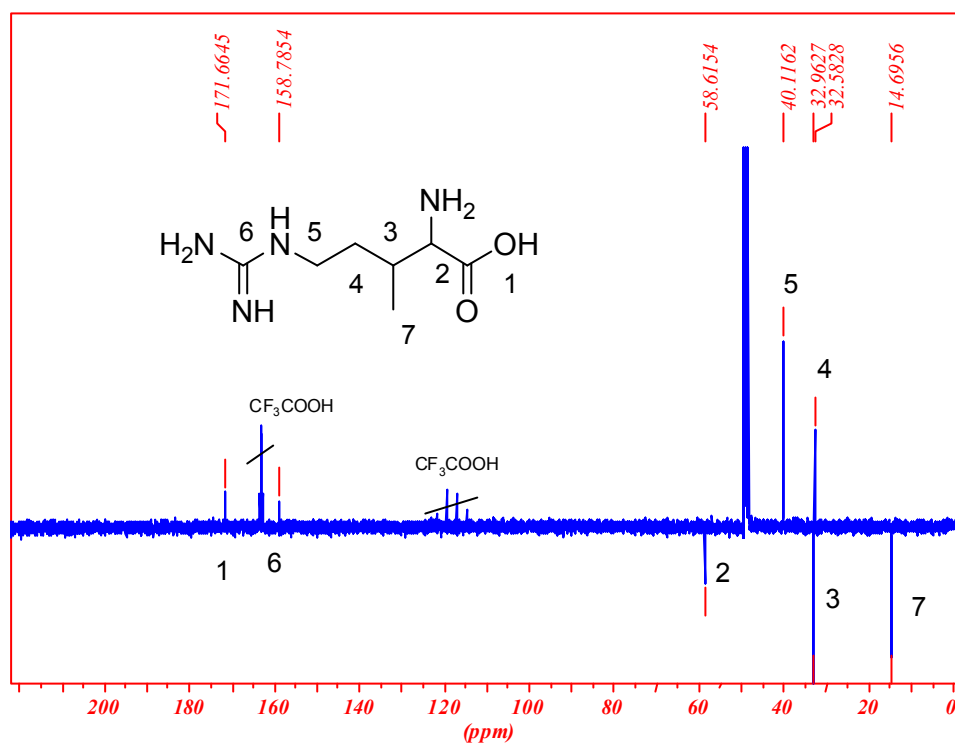
2.4 ^1H -NMR of 3-methylarginine (1) (500 MHz, MeOD, 300 K)



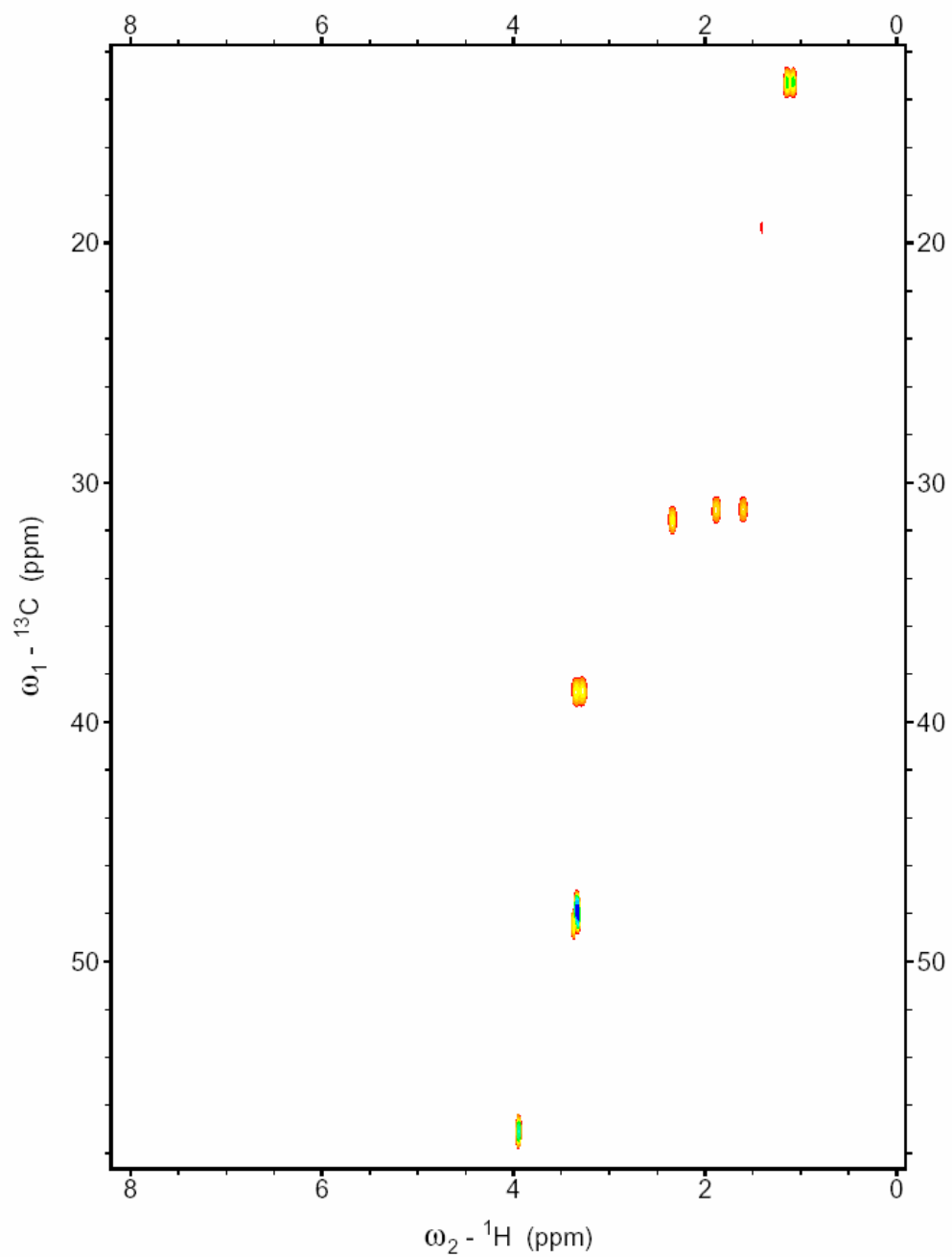
2.5 H,H-COSY of 3-methylarginine (1) (500 MHz, MeOD, 300 K)



2.6 APT-NMR spectrum of 3-methylarginine (1) (125 MHz, MeOD, 300 K)



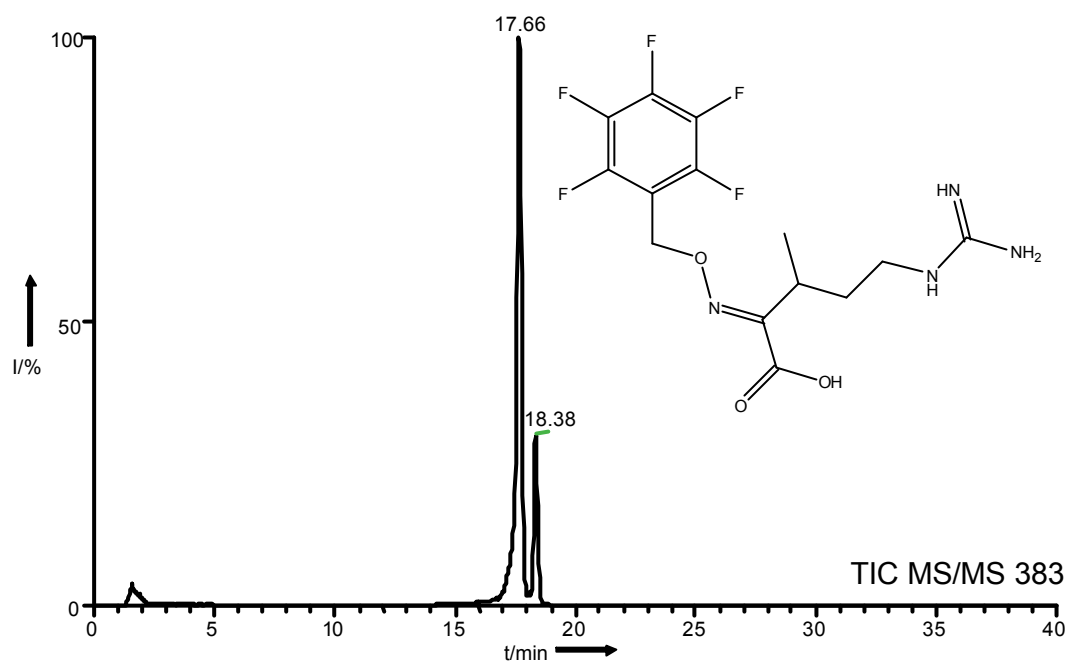
2.7 HSQC-NMR spectrum of 3-methylarginine (1) (500 MHz, MeOD, 300 K)



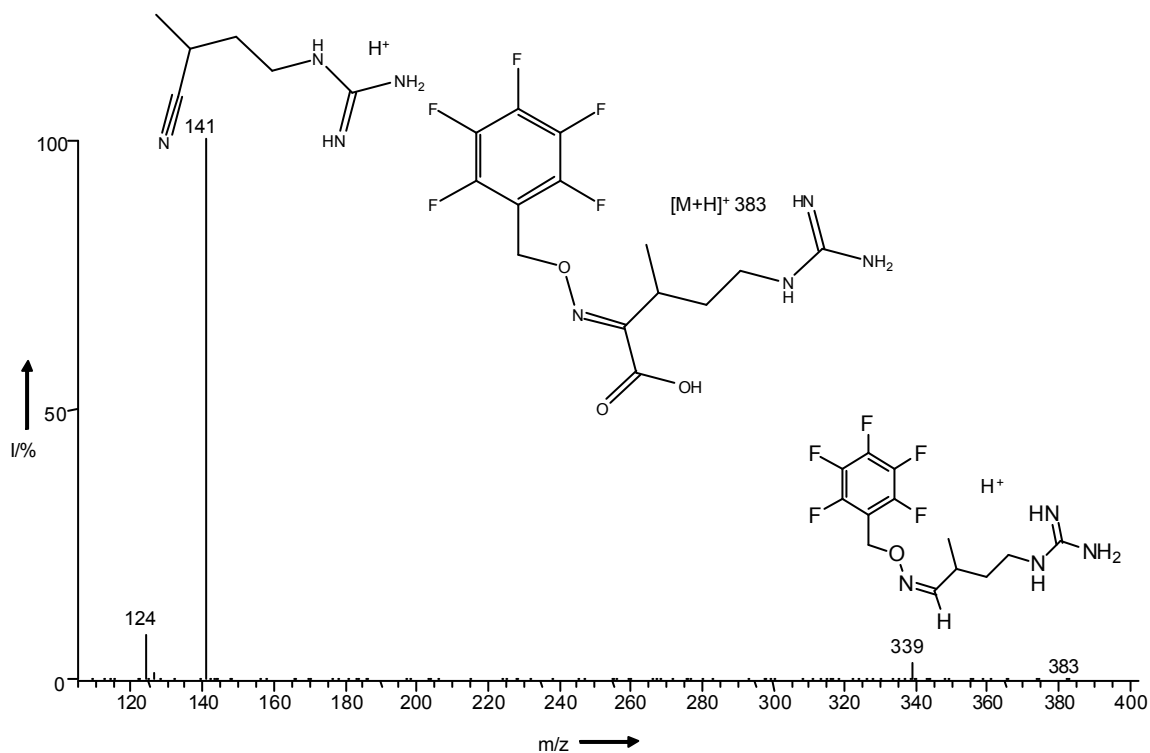
3 Determination of the stereochemistry of 3-methylarginine (1)

3.1 TIC of MS/MS of $[M+H]^+$ 383, detection of 2-oxo-3-methylarginine (7) as pentafluorobenzoyloxime derivative

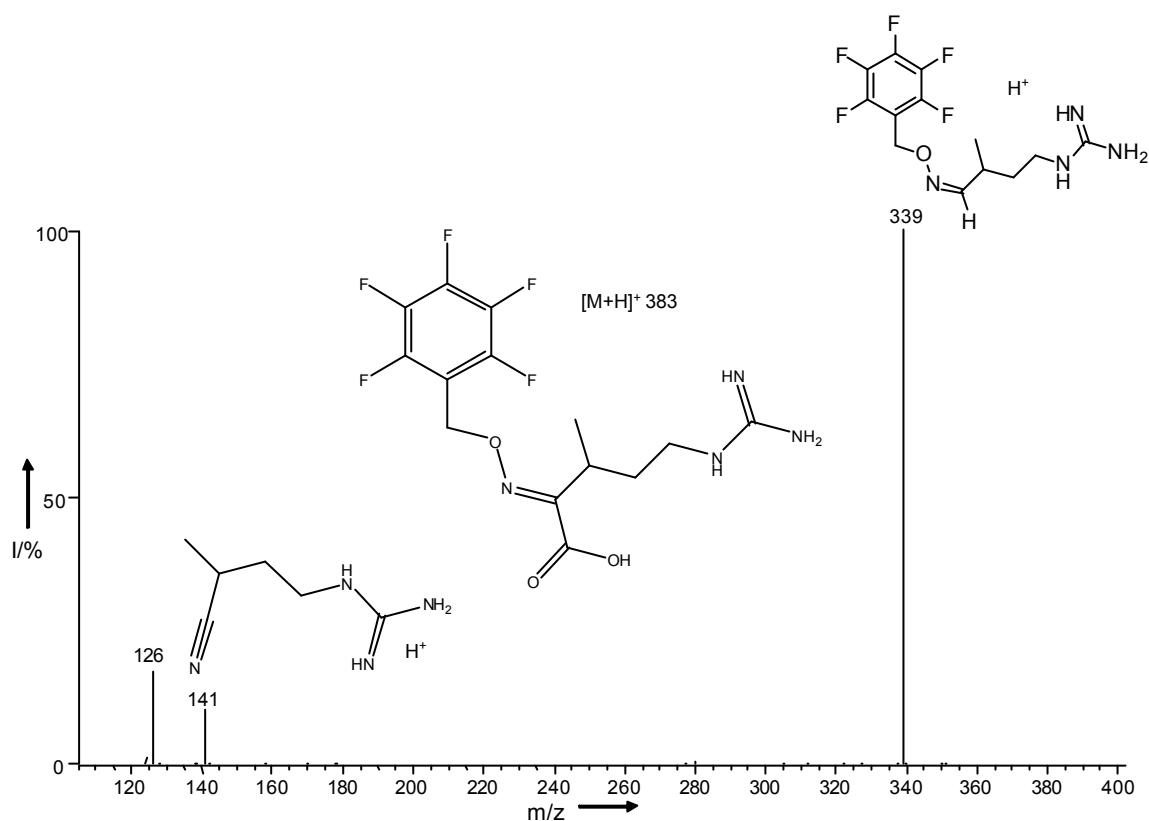
HPLC column: Grom-Sil ODS 7 PH (125 mm x 2 mm, 4 μ m)



3.2 MS/MS of $[M+H]^+$ 383 of the pentafluorobenzoyloxime derivative of 2-oxo-3-methylarginine (7, 17.66 min)



3.3 MS/MS of $[M+H]^+$ 383 of the pentafluorobenzyloxime derivative of 2-oxo-3-methylarginine (7, 18.38 min)

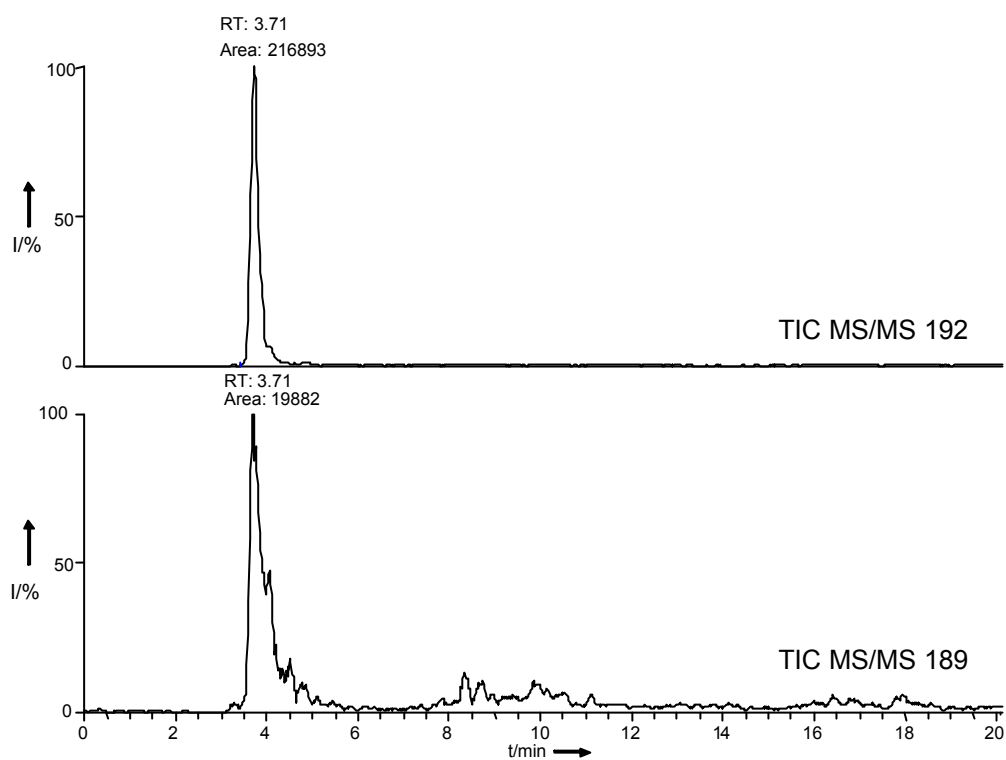


4 Incorporation of $[^2H_3]$ -methionine into $[^2H_3]$ -3-methylarginine

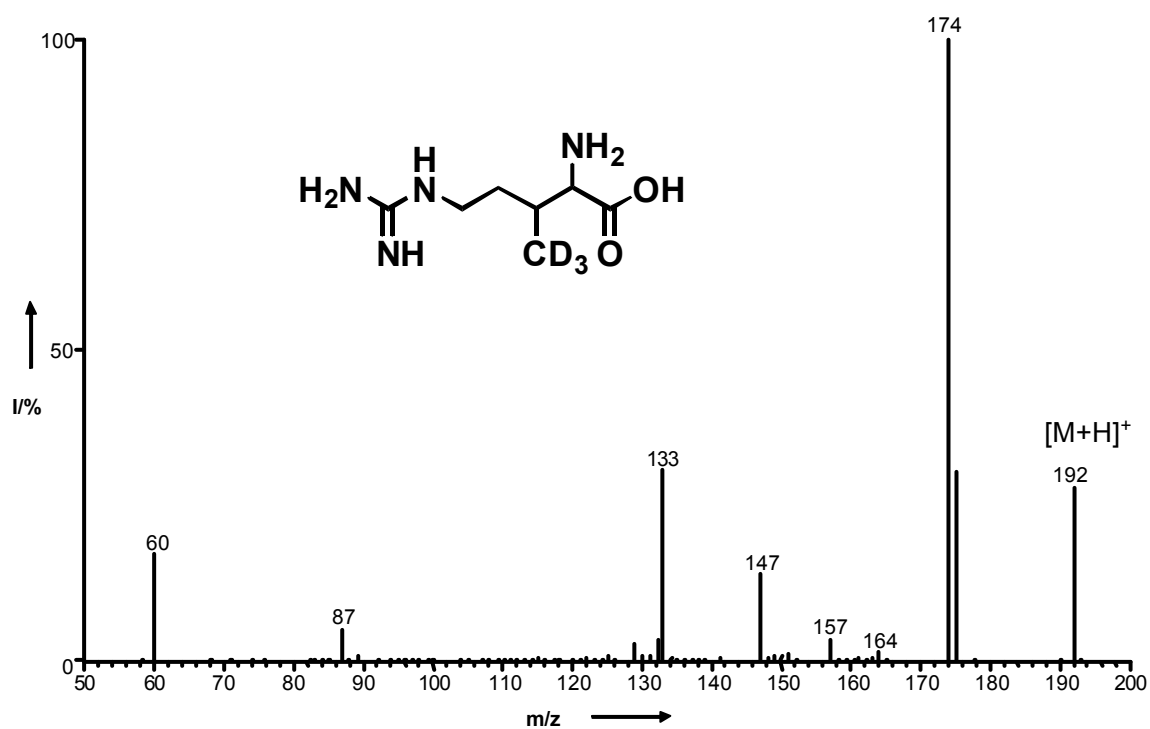
4.1 $[^2H_3]$ -3-methylarginine (1b):3-methylarginine (1) ESI-MS/MS

$[^2H_3]$ -3-methylarginine (**1b**):3-methylarginine (**1**) show identical retention time in the HPLC. In order to analyse the incorporation of the $[^2H_3]$ -methyl group into $[^2H_3]$ -3-methylarginine the ion trace of the $[M+H]^+$ 192 of the labeled $[^2H_3]$ -3-methylarginine (**1b**) is compared to the ion trace of the $[M+H]^+$ 189 of the unlabeled 3-methylarginine (**1**).

HPLC column: Phenomenex Synergy polar RP (150 mm x 2 mm, 4 μ m)



4.2 ESI-MS/MS of the $[M+H]^+$ 192 of $[^2H_3]$ -3-methylarginine (1b)



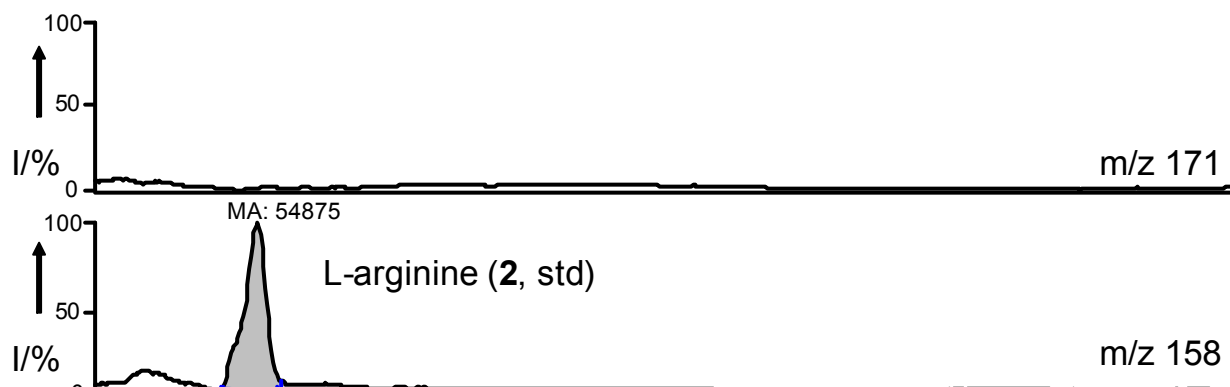
5 Analysis of 3-methylarginine (1) production by the methyltransferase mutant in comparison to the wild type

5.1 Comparison of 3-methylarginine (1) production of cultures grown in presence of spectinomycin

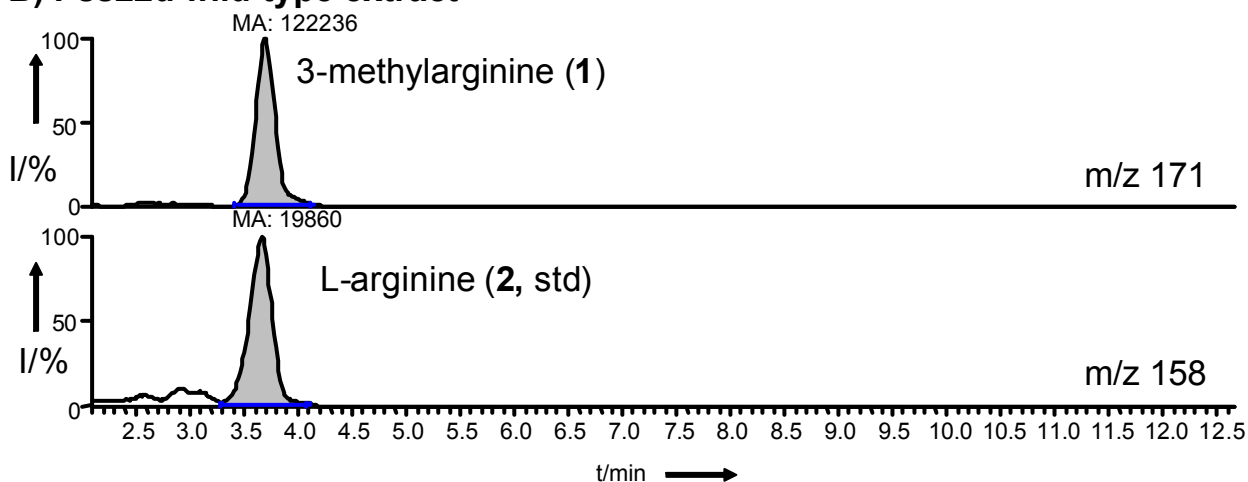
For the analysis of 3-methylarginine (1) production the key fragments of the ESI-MS/MS of the $[M+H]^+$ of 3-methylarginine (1) 171 and the $[M+H]^+$ of arginine (2) 158 that was added before workup as standard (std, 5 $\mu\text{g/mL}$) were recorded. The ratios of the peak areas of wild-type and the methyltransferase mutant Pss22d.1 were compared.

HPLC column: Phenomenex Synergy polar RP (150 mm x 2 mm, 4 μm)

A) Pss22d.1 methyltransferase mutant extract



B) Pss22d wild type extract



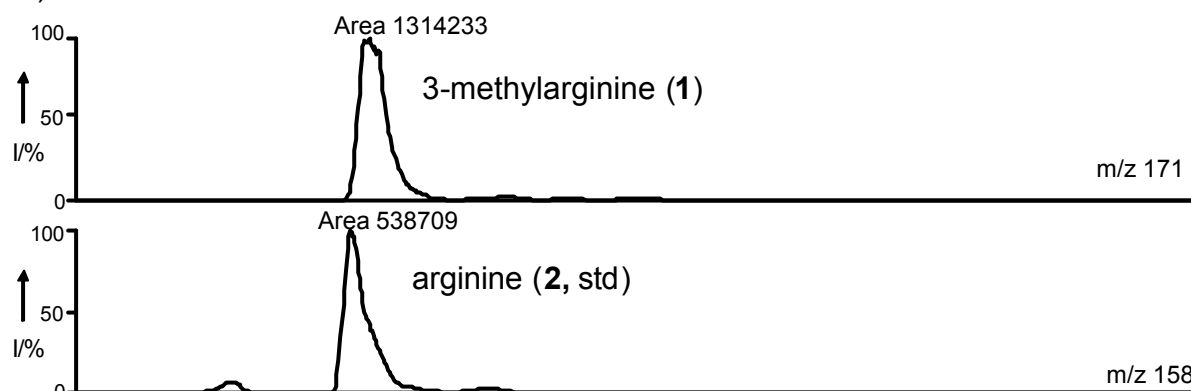
5.2 Comparison of 3-methylarginine (1) production of cultures grown without spectinomycin

For the analysis of 3-methylarginine (1) production the key fragments of the ESI-MS/MS of the $[M+H]^+$ of 3-methylarginine (1) 171 and the $[M+H]^+$ of arginine (2) 158

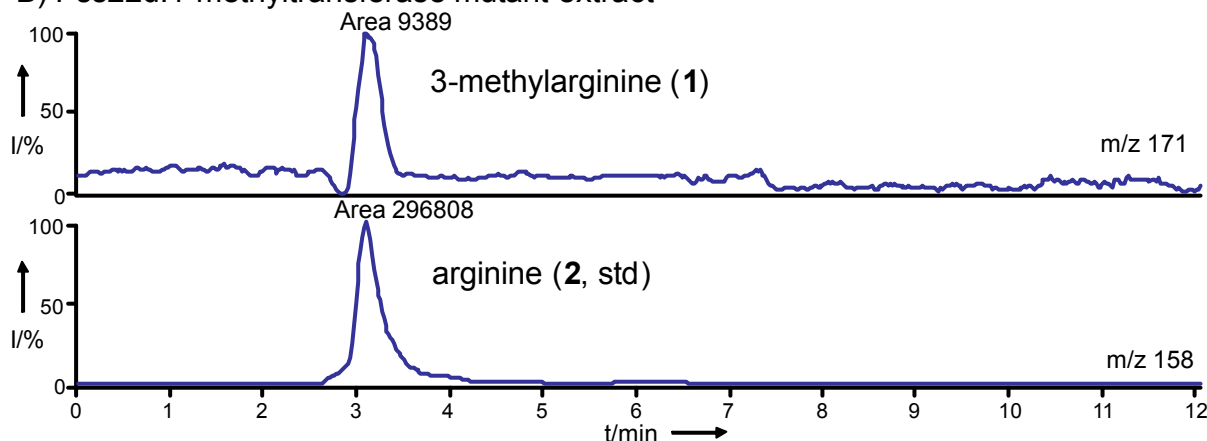
that was added before workup as standard (std, 5 µg/mL) were recorded. The ratios of the peak areas of wild type and the methyltransferase mutant Pss22d.1 were compared.

HPLC-column: Phenomenex Synergy polar RP (150 mm x 2 mm, 4 µm)

A) Pss22d extract



B) Pss22d.1 methyltransferase mutant extract



Grown without the selective marker spectinomycin in the highly sensitive LC-MS/MS mode a very weak signal for 3-methylarginine (1) could be detected (ratio 80:1 Pss22d wild-type: Pss22d.1 mutant grown without selection marker spectinomycin). The amount of the compound observed by LC-MS-MS in the mutant culture was not sufficient to cause an inhibition zone in the agar diffusion assay.

A possible explanation for the trace production of 3-methylarginine (1) under growth conditions missing the antibiotic selection pressure is that individual cells of Pss22d.1 reconstituted their biosynthetic pathway by removal of the transposon element. Pseudomonads are well known for their efficient DNA repair mechanisms.^[1] Nevertheless, our experiments give evidence that the identified methyltransferase is involved in the biosynthesis of 3-methylarginine (1).

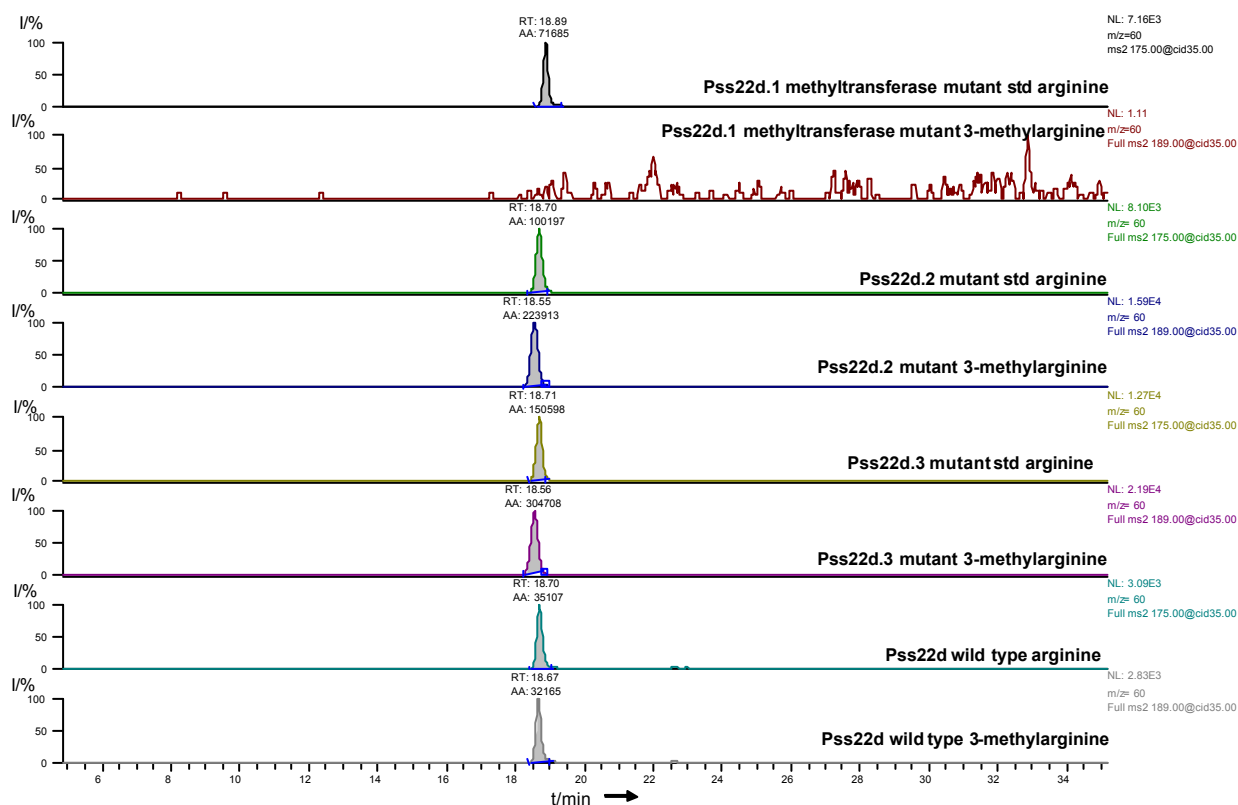
- [1] P. Cornelis, V. Anjaiah, N. Koedam, P. Delfosse, P. Jacques, P. Thonart, L. Neirinckx, *J Gen Microbiol* **1992**, 138, 1337-1343.

5.3 Comparison of 3-methylarginine (1) production of different mutants

The mutants Pss22d.1 (methyltransferase mutant), Pss22d.2 and Pss22d.3 were grown in presence of spectinomycin and analysed for their formation of 3-methylarginine (1). For comparison also the wild type Pss22d (grown without spectinomycin) was analysed. Shown is the ion trace of m/z 60 of the ESI-MS/MS of 189 (3-methylarginine (1)) and the ion trace of m/z 60 of the ESI-MS/MS of 171 (arginine standard, 20 $\mu\text{g/mL}$). The peak ratio of 3-methylarginine (1) to the standard allows the comparison of the different sample.

No production was observed for Pss22d.1 methyltransferase mutant, the other two mutants Pss22d.2 and Pss22d.3 did produce 3-methylarginine (1) like the wild-type Pss22d.

HILIC-conditions: Phenomenex Luna NH_2 (250 mm x 2 mm, 5 μm), solvent A: H_2O 0.1 % AcOH; B MeCN 0.1 % AcOH; gradient: 3 min 100 % B, in 27 min 100 % A, 100 % A 5 min, injection volume 10-100 μL)



3.2. Manuskript II

Braun S. D., J. Hofmann, A. Wensing, M. S. Ullrich, H. Weingart, B. Völksch, D. Spiteller

Identification of the biosynthetic gene cluster of 3-methylarginine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93.

eingereicht bei: Applied and Environmental Microbiology

Identification of the biosynthetic gene cluster of 3-methylarginine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93

S. D. BRAUN¹, J. HOFMANN¹, A. WENSING², M. S. ULLRICH², H. WEINGART², B. VÖLKSCH¹, D. SPITELLER^{3*}

¹Institute of Microbiology, Microbial Phytopathology, University of Jena, Neugasse 25, 07743 Jena, Germany, ²Jacobs University Bremen, School of Engineering and Science, Campus Ring 1, 28759 Bremen, Germany, ³Max Planck Institute for Chemical Ecology, Bioorganic Chemistry, Hans-Knöll-Strasse 8, 07745 Jena, Germany

Received / Accepted

Keywords: biocontrol, 3-methylarginine, methyltransferase, plant pathogen, *Pseudomonas syringae*

Running title: 3-Methylarginine biosynthetic gene cluster

Subject category: Genetics and molecular biology

*Corresponding author: Mailing address: Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology D-07745 Jena, Germany. Phone: +49 (0)3641 571258. Fax: +49 (0)3641 571256. E-mail: dspiteller@ice.mpg.de.

ABSTRACT

The epiphyte *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d) produces the rare amino acid 3-methylarginine (MeArg) that is highly active against the closely related soybean pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg). Competing for the same habitat, Pss22d is a promising candidate for biocontrol of Psg. The MeArg biosynthesis gene cluster codes for the *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferase MrsA, the aminotransferase MrsB and the amino acid exporter MrsC. Transfer of the whole gene cluster into *E. coli* resulted in heterologous production of MeArg. The methyltransferase MrsA was overexpressed in *E. coli* as His-tagged protein and functionally characterized. The highly selective methyltransferase MrsA transfers the methyl group from SAM onto 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid to yield 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid. Analysis of various Tn5 mutants affected in MeArg production suggests a role of the GacS/GacA and PhoP/PhoQ regulatory systems to control MeArg production by Pss22d.

INTRODUCTION

Microbial plant pathogens cause severe losses in agriculture each year (1). For example, the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg) is responsible for bacterial blight of soybean, a leaf spot disease of great economic impact. Besides chemical treatment, biocontrol agents that antagonize microbial plant pathogens gain increasing importance in fighting plant diseases (9, 18, 42). In a screening for possible biocontrol strains, an epiphytic bacterium showing a strong and selective activity against the pathogen Psg was isolated from soybean leaves (46). The strain 22d/93 was characterized as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss22d). The antagonism of Pss22d against Psg has been successfully demonstrated *in vitro* and *in planta*, under greenhouse and field conditions (31, 46). In order to identify the molecular basis of the antagonism of Pss22d against Psg we focused on its secondary metabolites. Besides the well-known lipodepsipeptides syringomycin and syringopeptin (4), Pss22d produces the rare amino acid 3-methylarginine (MeArg) (6). As little as 20 nmol of MeArg strongly and selectively inhibits Psg but no other pseudomonads *in vitro* (46). Since the inhibition can be compensated for by L-arginine supplementation but not by any other essential amino acid, it is likely that the toxin acts as inhibitor of the arginine biosynthesis or an arginine-dependent pathway such as nitric oxide formation (20, 24). Feeding experiments and Tn5 transposon mutagenesis suggested that MeArg is produced by an *S*-adenosyl methionine

(SAM)-dependent methyltransferase (6) converting the enol of 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid to 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid. An analogous reaction is known from the methyltransferases GlmT, DptI, and LptI which form 3-methylglutamate from α -ketoglutarate (30). On the way to MeArg only a transaminase catalyzing the formation of MeArg from 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid and an amino acid exporter to secret the toxin would be needed.

Here, we describe the identification and functional characterization of the MeArg biosynthesis gene cluster from the epiphyte Pss22d.

MATERIAL AND METHODS

Strains, plasmids and cultivation conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *P. syringae* strains were cultured and maintained on King's B (KB) medium (25). The Pss22d mutants were cultivated on selective KB medium containing spectinomycin (25 μ g/ml). The complemented strain Pss22d.1C was grown on KB agar containing kanamycin (25 μ g/ml). *Escherichia coli* strains were maintained on Standard 1 medium (Merck). The strains Ec3150 and Ec2795 were cultivated on Standard 1 agar containing ampicillin (25 μ g/ml).

Agar diffusion assay. In order to test for MeArg production by *P. syringae* pv. *syringae* strains, agar diffusion assays with Psg1a as indicator strain were performed (6). Briefly, Psg1a was cultured on KB agar plates overnight at 28°C. Single colonies of Psg1a were used to prepare a suspension of approximately $4 \cdot 10^8$ cfu/ml in sterile water. For preparation of test plates (\varnothing 135 mm), 50 ml of 5b agar medium (16) was warmed to 50°C and supplemented with 2 ml of the Psg1a suspension. The to-be-tested strains were inoculated onto the agar plates and the plates were incubated at 28°C for 24 h. To determine the relative toxin concentration a standard curve using purified MeArg was generated (5). Syringomycin and syringopeptin production was determined using agar diffusion assays against *Geotrichum candidum* and *Bacillus megaterium* as indicator strains, respectively (41).

Tn5 mutagenesis. Transposon mutagenesis of Pss22d was performed by two-parental matings using *E. coli* S17-1 λ pir containing the plasmid pUT/mini-Tn5 Sm/Sp (48) as donor strain. Plate matings were carried out on Standard 1 agar at 28°C overnight. Pss22d mutants were selected on MG agar (23) containing spectinomycin (25 μ g/ml) as selection

agent. The accession numbers of Pss22d.1, the methyltransferase *mrsA* knock out mutant, and Pss22d.2 – Pss22d.8, regulatory mutants, are given in Table 2. The growth rates of Pss22d and its mutants were determined in HSC medium (35) at 28°C by measuring the OD_{578nm}.

Cloning and sequencing of the 3-methylarginine biosynthesis cluster. Genomic DNA was isolated following standard procedures (40). Preparation of plasmid DNA was performed using the QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The insertion sites of the Tn5 in Pss22d mutants were determined by cloning the insertion loci into the plasmid pBBR1MCS and sequencing of the insert (6). A 265-bp fragment flanking the Tn5 insertion in the MeArg-deficient mutant Pss22d.1 showed high homology to SAM-dependent methyltransferases and was identified as part of the MeArg biosynthesis gene cluster (6). The non-coding region upstream of the methyltransferase gene was used to design the reverse primer MT_{rev} (5'-ATCAGGAATGCGGCACTACA-3'). Analysis of the sequences surrounding the methyltransferase gene in the genome sequence of *P. syringae* pv. *syringae* B728a (PssB728a) revealed the presence of two ORFs showing high similarity to genes coding for an aminotransferase and an amino acid exporter, respectively. The genome sequence of PssB728a was used to design the forward primer LT_{fwd} (5'-TTGGATTCGCGGTTTCGA-3') binding a sequence in the amino acid exporter gene. A 2,795-bp fragment was PCR amplified from genomic DNA of Pss22d using the primers LT_{fwd} and MT_{rev} and cloned into pJET 1.2 (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) yielding plasmid pJ2795, which was sequenced using standard primers from the pJET 1.2 kit. Additionally, the 2,795 bp fragment was cloned into pGEM T-easy (Promega, Mannheim, Germany) yielding plasmid pG2795. To clone the complete biosynthesis cluster an adaptor-PCR was performed (38). Genomic DNA of Pss22d was digested with the restriction enzyme *Bcl*I and subsequently ligated with the *Bcl*I-adaptor (5'-GATCCCCTATAGTGAGTCGTATTAAC-3') overnight. Using the adaptor-primer (5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTAAC-3') and primer LT_{rev} (5'-ATTCCGTGGCTCTGAAGT-3'), derived from the sequence of the 2,795-bp fragment in pJ2795, a 1,342-bp fragment was PCR amplified from genomic DNA of Pss22d and cloned into pGEM T-easy, yielding plasmid pG1342. The primers MeArg_{fwd} (5'-GTGAATCACGCCTCGAAG-3') and MeArg_{rev} (5'-GGAGAGTCTGAATTTTTGCG-3') were deduced from the sequences of pJ2795 and pG1342 and used to PCR amplify the complete MeArg biosynthesis gene cluster of Pss22d. The amplified 3,150-bp fragment was cloned into pJET 1.2, yielding plasmid pJ3150, which was sequenced using standard primers from

the pJET 1.2 kit. For complementation of MeArg-deficient mutants, the 3,150-bp fragment was first cloned into pGEM T-Easy, yielding plasmid pG3150. Subsequently, a 3,150-bp *XhoI-XbaI*-fragment cut from pJ3150 was ligated into *XhoI-XbaI*-digested pBBR1MCS, yielding plasmid pB3150.

***In silico* analysis of the 3-methylarginine biosynthetic genes.** The nucleotide sequence of the putative MeArg biosynthetic gene cluster was translated into the corresponding amino acid sequences and analyzed using the BLASTP program of the National Center for Biotechnology Information. The fragment cloned in pJ3150 was compared to the genome sequence of PssB728a using VectorNTI software (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), ClustalX2 (45) and TreeViewX (34). Promotor site prediction was performed with BPROM software (Softberry Inc., Mount Kisco, NY, USA).

Cloning of the SAM-dependent methyltransferase MrsA. The SAM-dependent methyltransferase MrsA was PCR amplified from genomic DNA of Pss22d using the primers MT_{fwd} (5'-CATATGAAATCTGCTTGACTCTATAAA-3') and MT_{rev} (5'-CTCGAGTCATGCCCTCCGCAGCAGATA-3'). The start and stop codons are shown in bold, and the *NdeI* and *XhoI* restriction sites are underlined. The amplified 1,060-bp fragment was digested with *NdeI* and *XhoI* and cloned into *NdeI-XhoI*-digested pET28b(+) (Novagen), yielding plasmid pET28b(+)-MrsA. The identity of the insert was confirmed by sequencing (Jenagen, Jena, Germany).

Overproduction and purification of MrsA. To overproduce the SAM-dependent methyltransferase MrsA, the plasmid pET28b(+)-MrsA was transformed into *E. coli* BL21(DE3). 1 l of Standard 1 medium containing kanamycin (25 µg/ml) was inoculated with 20 ml of an overnight culture and incubated at 200 rpm at 37°C. At an OD₅₇₈ of 0.9 - 1.2, cultures were induced with 0.2 ml of 1 M isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and then incubated at 16°C until an OD₅₇₈ of 1.8 - 2.0. The cells were harvested by centrifugation. After resuspension of the cells in 50 ml binding buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.9, 5 mM imidazole, 10% glycerol), the cells were broken using a French[®] Pressure Cell Press (SIM-AMINCO, Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY, USA). The cell lysate was centrifuged (8000 g, 4°C, 40 min), and the supernatant was loaded onto the Ni²⁺-nitrilotriacetate resin (Qiagen, Hilden, Germany; pre-equilibrated with binding buffer). The column was washed with 10 ml binding buffer and 10 ml wash buffer

(20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.9, 60 mM imidazole, 10% glycerol). To elute the methyltransferase, 6 ml of elution buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.9, 200 mM imidazole, 10% glycerol) were added. Imidazole was removed by buffer exchange to 100 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7.5 using Vivaspin-6 concentrators (30000 MWCO, Vivascience, Hannover, Germany, 6000 g, 4°C, 60 min). The purity of the methyltransferase MrsA was determined by SDS-PAGE and ESI-MS.

Generation of 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid. 50 mg of D-arginine in 5 ml phosphate buffer (30 mM, pH 8.3) were incubated with 46 units of D-amino acid oxidase from porcine kidney (Sigma, Deisenhofen, Germany) and 29.500 units of catalase from bovine liver (Sigma, Deisenhofen, Germany) for 24 h. After precipitation of the enzyme by acidification (pH 1.0) and vortexing with 5 ml CH₂Cl₂, the aqueous layer was concentrated and subjected to MPLC (Büchi, Flawil, Switzerland) purification using RP-18 resin and gradient elution (solvent A: H₂O, solvent B: MeOH). For LC-MS analysis an Agilent HP1100 HPLC system (Agilent, Waldbronn, Deutschland) hooked to an LTQ mass spectrometer fitted with a Phenomenex (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) Luna NH₂-HPLC column (150 mm x 2 mm, 5 µm) under HILIC (6) conditions was used. HPLC program: 3 min 100% A, in 27 min 100% B; flow rate 0.2 ml/min; solvent A: MeCN, 0.1% AcOH; solvent B: H₂O, 0.1% AcOH. HR-ESI-MS/MS experiments were performed by direct injection of purified samples into an LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher, Egelsbach, Germany).

5-Guanidino-2-oxo-pentanoic acid: Retention time: 23.0 min. ESI-HR-MS: [M+H]⁺ measured: 174.08748, calculated: 174.08787; ESI-MS/MS of [M+H]⁺: 60 (2), 70.06532 (41), 114.05496 (100), 130.09769 (8), 156.07690 (12).

Functional characterization of the MrsA. In order to determine the methyltransferase activity for the conversion of 2-oxo-acids (5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid, pyruvate, phenylpyruvate, α-ketoglutarate) to 3-methyl-2-oxo-acids approximately 3.5 µg (0.9 nmol) of the methyltransferase was mixed with 2-oxo-acids (0.2 mmol) and S-adenosylmethionine (SAM) (0.2 mmol) in 125 µl reaction buffer (glycine buffer 30 mM, pH 8.5). The reaction mixture was incubated at 45°C for 40 min. Control reactions were performed without enzyme, SAM or 2-oxo-acids, respectively. All incubations were stopped by addition of 10 µl HCl (10 M) and 50 µl CH₂Cl₂ and vortexing. The conversion of 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid to 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid at

different pH and temperature values was analyzed by LC-ESI-MS/MS comparing the peak ratios of 2-oxo-acid to 3-methyl-oxo-acid (HPLC conditions see above). The pH optimum of the methyltransferase was studied over a pH range of 1.0 to 11.0 using citrate buffer (30 mM, pH 1 - 5), phosphate buffer (30 mM, pH 5 - 8.5) and glycine buffer (30 mM, pH 8.5 - 11). The temperature dependence of the enzyme was analyzed from 10°C to 60°C (30 mM phosphate buffer, pH 8.0).

For NMR analysis of 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid, 4 mg 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid (23 mmol), 10 mg SAM (23 mmol) and 60 µg enzyme were incubated in PBS buffer (30 mM, pH 8.3) overnight. After precipitation of the enzyme by vortexing with CHCl₃, the sample was centrifuged, the aqueous layer concentrated *in vacuo* and subjected to MPLC separation followed by HPLC purification (see above). NMR measurements were performed with a Bruker DRX 500 spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany) using the D₂O signal for calibration (D₂O 4.68 ppm).

5-Guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid: Retention time: 22.0 min. ESI-HR-MS: [M+H]⁺ measured: 188.10320, calculated: 188.10352; ESI-MS/MS of [M+H]⁺: 60 (0.2), 84.08094 (11), 128.07075 (100), 144.11314 (1.5), 170.09250 (7.7). ¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ 0.85 (d, *J*=6.85, 3H), 1.51-1.61 (m, 1H), 1.93-2.01 (m, 1H), 2.25-2.34 (m, 1H), 3.28-3.36 (m, 1H), 3.44-3.51 (m, 2H).

RESULTS

Characterization of Pss22d Tn5 mutants with altered 3-methylarginine production.

To identify the genes involved in MeArg biosynthesis, mini-Tn5 mutagenesis was carried out. Out of 2,468 Tn5 mutants, 21 were affected in their MeArg production. Six mutants were selected for detailed analysis of their 3-methylarginine, syringomycin and syringopeptin production profile (Table 2). Five of these mutants showed a different production pattern for syringomycin and syringopeptin compared to the wild type. Pss22d.2, Pss22d.3, and Pss22d.6 did not produce syringomycin and MeArg, but still produced similar amounts of syringopeptin as the wild type. The mutants Pss22d.7 and Pss22d.8 showed a dramatic increase in both syringomycin and MeArg production. Only the mutant Pss22d.1 was not producing MeArg but its lipodepsipeptide formation was comparable to the wild type.

Sequencing of the DNA flanking the miniTn5 insert in the six selected mutants revealed their affected regulatory systems. In Pss22d.3 a region with high similarity to the global regulator gene *gacS* (8, 19) was destroyed. Pss22d.2 had the Tn5 insertion in a gene similar

to the two-component regulator system PhoP-PhoQ (14, 28) and in Pss22d.6 the transcriptional regulator gene *arsR* was knocked out (36). Pss22d.7 and Pss22d.8, which overexpress MeArg, carried the insertion in regions highly similar to genes of an ATP-dependent protease (44) and ORF 3 involved in the mangotoxin biosynthesis (3), respectively.

In the mutant Pss22d.1, the insertion was located in a gene with high similarity to genes coding for SAM-dependent methyltransferase from PssB728a (psyr_118; 96% identity) and *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aave_3704, 75% identity) (Fig. 1). Due to the high homology of the disrupted gene to SAM-dependent methyltransferases, the mutant Pss22d.1 was a promising candidate for a MeArg biosynthesis mutant because this enzyme function is necessary to produce MeArg (6).

Analysis of the 3-methylarginine biosynthesis gene cluster. Sequencing of the flanking regions of the Tn5 insertion in the MeArg-deficient mutant Pss22d.1 revealed insertion of the transposon in a gene coding for a SAM-dependent methyltransferase. A BLASTP search identified a homologous sequence in the genome of PssB728a. Analysis of the sequences surrounding the methyltransferase gene in PssB728a revealed the presence of two ORFs showing high similarity to genes coding for aminotransferases and amino acid exporters, respectively. Thus, the sequences of PssB728a were used to design primers to PCR amplify the putative MeArg biosynthesis gene cluster from genomic DNA of Pss22d. Because no significant similarities were found in the sequences downstream of the exporter gene adaptor-PCR was used to identify the downstream sequence in Pss22d. Finally, two primers, MeArg_{fwd} and MeArg_{rev}, were designed to amplify a 3,150-bp fragment from Pss22d containing the complete MeArg biosynthesis cluster. The three ORFs were designated *mrsA*, *mrsB*, and *mrsC* for 3-methylarginine synthesis. Analysis of the deduced amino acid sequences indicated high degrees of similarity between the proteins from Pss22d and PssB728a (93 to 96% identity) (Fig. 1). Moreover, MrsA and MrsB showed significant sequence homology to a putative methyltransferase (Aave_3704, 75% identity) and a putative aminotransferase (Aave_3705, 66% identity), respectively, from *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* AAC00-1. However, no homologue of MrsC was found in *A. avenae* subsp. *citrulli* (Fig. 1).

MrsA was predicted as a SAM-dependent methyltransferase with a conserved SAM domain belonging to the type 12 family (6). MrsB contains the typical motifs for an aminotransferase of family I (15) (Fig. 2a). From the multiple sequence alignment with

members of the aminotransferase family I we deduced that MrsB belongs to the subfamily I γ (22). This subfamily contains aminotransferases catalyzing the formation of different amino acids, e.g. lysine and tyrosine (Fig. 2b) (15, 22). MrsC shows high similarity to a putative lysine transporter from PssB728a (11) and belongs to the LysE superfamily. A detailed motif analysis revealed that MrsC groups to the RhtB subfamily (2) (Fig. 3).

A precise analysis of the sequences of *mrsA* and *mrsB* revealed an overlapping region in the start/stop sequence (*mrsA*-ATGA-*mrsB*) (Fig. 1). This suggests that both ORFs form an operon, which was supported by finding of only one putative promoter region (Fig. 1). Downstream of the MeArg biosynthesis cluster a gene with high similarity to a putative transposase from PssB728a was found. Upstream of the MeArg biosynthesis cluster an ORF with similarity to a gene coding for a mannurane C-5-epimerase from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (41 % amino acid identity) was identified.

Complementation of the mutant Pss22d.1 and heterologous expression of the entire MeArg biosynthesis gene cluster in *E. coli*. The MeArg-deficient mutant Pss22d.1 was complemented with the plasmid pB3150 harboring the genes *mrsA*, *mrsB* and *mrsC*. This complementation completely restored MeArg production in Pss22d.1 resulting in a similar growth inhibition of Psg1a in the agar diffusion assay as the wild type Pss22d (Table 2, Fig. 4) Moreover, the high-copy plasmid pG3150 containing the MeArg biosynthesis genes *mrsA*, *mrsB* and *mrsC* from Pss22d was introduced into *E. coli* DH5 α . The resulting strain Ec3150 produced MeArg. In HSC liquid medium (Table 2) Ec3150 generated only low amounts of MeArg but on 5b agar plates Ec3150 produced similar amounts of MeArg as the parent strain Pss22d causing a comparable inhibition zone in the agar diffusion assay against Psg (Fig. 4). The inhibition zones in the agar diffusion assay caused by Ec3150 were completely reversed after addition of 0.1 mM arginine (Fig. 4). Furthermore, the production of MeArg was verified by LC-MS/MS.

Heterologous expression and functional characterization of the SAM-dependent methyltransferase MrsA. In order to characterize the key enzyme in the biosynthesis of 3-methylarginine we overexpressed the SAM-dependent methyltransferase MrsA as His-tagged protein in *E. coli* BL21(DE3) using plasmid pET28b(+)-MrsA. Overexpression and following enzyme purification yielded 7 mg/ml pure protein as can be seen on the SDS-PAGE (Fig. 5a). ESI-MS analysis confirmed the identity of the protein with the measured

M-Met = 40766 Da being in very good accordance to the calculated mass of 40765 Da (Fig. 5b).

The methyltransferase MrsA efficiently converts 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid to 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid in presence of SAM (Fig. 6). Control reactions without enzyme or without one of the substrates did not show any product formation. The enzyme has its pH optimum at pH 9. The catalytic activity decreases 3-fold at pH 7 and 10-fold at pH 10. At 42°C maximal conversion was achieved, whereas at the physiological 28°C the enzyme activity decreases 3-fold compared to the optimum. The methylation of 200 µmol 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid is fast with ca. 0.9 nmol methyltransferase leading to 50% conversion within 45 min. Offering other 2-oxo-acids such as pyruvate, α-ketoglutarate and phenylpyruvate as substrate did not result in any 3-methyl-2-oxo-acid formation.

DISCUSSION

Using Tn5 transposon mutagenesis the 3-methylarginine-deficient mutant Pss22d.1 was obtained that served us to identify a 3-kb gene cluster responsible for the biosynthesis of MeArg. The gene cluster contained three ORFs designated *mrsA*, *mrsB* and *mrsC*. MrsA showed high homology to SAM-dependent methyltransferases. MrsB was identified as aminotransferase belonging to the subfamily I_γ and MrsC was assigned to code for an 3-methylarginine exporter due to its similarity to amino acid exporters (2) (Fig. 1). The SAM-dependent methyltransferase MrsA methylates 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid to 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid. Subsequently, the aminotransferase MrsB transaminates 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic to give 3-methylarginine which is secreted via the MeArg exporter MrsC (Fig. 7)

The involvement of the three genes in MeArg biosynthesis was proven by complementation of the mutant Pss22d.1 with the plasmid pB3150 harboring the entire MeArg biosynthesis gene cluster (*mrsA*, *mrsB* and *mrsC*). The complemented mutant showed a clear inhibition of *P. syringae* pv. *glycinea* in the agar diffusion assay. In addition, *E. coli* DH5α bearing the plasmid pG3150 was shown to produce MeArg using the agar diffusion assay and LC-MS for detection. In contrast, *E. coli* DH5α bearing plasmid pG2795 that harbors only the genes *mrsA* and *mrsB* did not cause an inhibition zone in the agar diffusion assay, which suggests the function of MrsC as MeArg exporter (Fig. 4). The deduced genes from the MeArg biosynthesis cluster of Pss22d showed a high identity to genes from PssB728a. However, in spite of PssB728a containing a similar set of

genes this strain did not produce MeArg. Possible reasons for this are a lack of function of the genes (96% identity to *mrsA*; 93% identity to *mrsB*; and 94% identity to *mrsC* at the protein level) or PssB728a does not express the corresponding proteins under the used growth conditions. Alternatively, another related product may be produced by PssB728a.

In order to study the MeArg biosynthesis cluster of Pss22d in more detail, we heterologously expressed its key enzyme, the methyltransferase MrsA, as His-tagged protein in *E. coli*. The purified enzyme converted 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid to 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid in presence of SAM as methyl group donor (Fig. 6). Other substrates (pyruvate, α -ketoglutarate, phenylpyruvate) were not accepted indicating that the enzyme is specific for this substrate like other related methyltransferases such as GlnT, DptI, and LptI that convert α -ketoglutarate to 3-methylglutamate in a highly selective manner (30). Unfortunately, our attempts to overexpress the aminotransferase MrsB in *E. coli* were not successful so far.

The analysis of Tn5 mutants with an altered MeArg production revealed that the global GacS/GacA regulatory system is involved in the regulation of MeArg production by Pss22d (Table 2). The GacS/GacA system is known to regulate many other compounds secreted by *Pseudomonas* spp. (19). Recently, it has been described that the *salA* gene, a member of the GacS/GacA system, is required for syringomycin production (26) and expression of a nonribosomal peptide-synthetase (NRPS) enzyme in *P. syringae* pv. *syringae* B301D (29, 37, 47). Notably, Pss22d.3 which has an insertion of Tn5 in the *gacS* gene does not produce MeArg and syringomycin which suggests a coordinated regulation of the production of both toxins. Another MeArg-negative mutant, Pss22d.2, was affected in a gene coding for the sensor histidine kinase protein PhoQ, a part of the two-component regulator system PhoP/PhoQ. Expression studies with *Salmonella* indicated that at least 40 proteins are controlled by the PhoP/PhoQ system (32). This system is highly negatively affected by the Mg^{2+} -ion concentration in the media as well as in the natural environment (43) and controls virulence in several Gram-negative bacteria (12, 28). Since the mutant Pss22d.2 did also not produce syringomycin (41), it seems that the PhoP/PhoQ system partly regulates the virulence of *P. syringae* (7). In the MeArg-negative Tn5 mutant Pss22d.6 a gene similar to *arsR* was disrupted. ArsR is known as a repressor protein that binds to the promoter region of different genes (39). The MeArg- and syringomycin-overproducing mutants Pss22d.7 and Pss22d.8 were affected in genes encoding an ATP-dependent protease and ORF 3 of the mangotoxin biosynthesis gene cluster (3), respectively. Most intercellular proteolysis is initiated by ATP-dependent proteases,

including Lon, FtsH, ClpAP and HslUV, which have been identified in *E. coli* (13). They are involved in the protein quality control by degrading misfolded and denatured proteins. Furthermore, they perform important regulatory functions by controlling the availability of regulatory proteins (21). It remains to be clarified whether the regulatory genes affect the production of MeArg directly or indirectly. Studying the regulation of the MeArg biosynthesis will contribute to reveal the ecological role of MeArg.

In summary, the genes responsible for the production of MeArg by the epiphyte Pss22d were identified. MeArg is synthesized from 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid that is methylated by the SAM-dependent methyltransferase MrsA. The resulting 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid is transaminated by the aminotransferase MrsB to give 3-methylarginine. The toxin is secreted via the amino acid exporter MrsC (Fig. 7). Identification of the MeArg biosynthesis gene cluster may provide the basis for its large scale biotechnological production in order to test its potential for control of the soybean pathogen Psg.

ACKNOWLEDGEMENT

S. D. B. and B. V. are grateful for financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (VO 558/6-3). D. S. is grateful for financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft with an Emmy Noether Fellowship (SP 1106/3-1) and thanks the Verband der Chemischen Industrie and the Max Planck Society for funding.

REFERENCES

1. **Agrios, G. N.** 2005. Plant Pathology, 5th ed. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA; San Diego, California, USA; London, UK.
2. **Aleshin, V. V., N. P. Zakataeva, and V. A. Livshits.** 1999. A new family of amino-acid-efflux proteins. Trends Biochem. Sci. **24**:133-135.
3. **Arrebola, E., F. M. Cazorla, D. Romero, A. Pérez-García, and A. de Vicente.** 2007. A nonribosomal peptide synthetase gene (*mgoA*) of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is involved in mangotoxin biosynthesis and is required for full virulence. Mol. Plant-Microbe Interact. **20**:500-509.
4. **Bender, C. L., F. Alarcon-Chaidez, and D. C. Gross.** 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**:266-292.
5. **Braun, S. D., J. Hofmann, A. Wensing, H. Weingart, M. Ullrich, D. Spiteller, and B. Völksch.** 2009. *In vitro* antibiosis by *Pseudomonas syringae* Pss22d, acting

- against the bacterial blight pathogen of soybean plants, does not influence *in planta* biocontrol. J. Phytopathol. **submitted (18/03/2009)**.
6. **Braun, S. D., B. Völksch, J. Nüske, and D. Spiteller.** 2008. 3-Methylarginine from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 suppresses the bacterial blight caused by its close relative *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. ChemBioChem **9**:1913-20.
 7. **Brinkman, F. S. L., E. L. A. MacFarlane, P. Warrener, and R. E. W. Hancock.** 2001. Evolutionary relationships among virulence-associated histidine kinases. Infect. Immun. **69**:5207-5211.
 8. **Chatterjee, A., Y. Y. Cui, H. L. Yang, A. Collmer, J. R. Alfano, and A. K. Chatterjee.** 2003. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. Mol. Plant-Microbe Interact. **16**:1106-1117.
 9. **Cirvilleri, G., A. Bonaccorsi, G. Scuderi, and M. Scortichini.** 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. J. Phytopathol. **153**:654-666.
 10. **de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J. Bacteriol. **172**:6568-72.
 11. **Feil, H., W. S. Feil, P. Chain, F. Larimer, G. DiBartolo, A. Copeland, A. Lykidis, S. Trong, M. Nolan, E. Goltzman, J. Thiel, S. Malfatti, J. E. Loper, A. Lapidus, J. C. Detter, M. Land, P. M. Richardson, N. C. Kyrpides, N. Ivanova, and S. E. Lindow.** 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **102**:11064-11069.
 12. **Fontan, P., S. Walters, and I. Smith.** 2004. Cellular signaling pathways and transcriptional regulation in *Mycobacterium tuberculosis*: Stress control and virulence. Curr. Sci. **86**:122-134.
 13. **Gottesman, S.** 2003. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **19**:565-87.
 14. **Groisman, E.** 2001. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. J. Bacteriol. **183**:1835-1842.

15. **Gu, W., G. Zhao, C. Eddy, and R. A. Jensen.** 1995. Imidazole acetol phosphate aminotransferase in *Zymomonas mobilis*: molecular genetic, biochemical, and evolutionary analyses. *J. Bacteriol.* **177**:1576-84.
16. **Guthke, R., J. Nüske, R. Schorcht, W. Fritsche, and W. Knorre.** 1984. Dynamic model of discontinuous and continuous phaseolotoxin production of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* **24**:427-435.
17. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-80.
18. **Handelsman, J., and E. V. Stabb.** 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* **8**:1855-1869.
19. **Heeb, S., and D. Haas.** 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:1351-1363.
20. **Ijuin, R., N. Umezawa, S. Nagai, and T. Higuchi.** 2005. Evaluation of 3-substituted arginine analogs as selective inhibitors of human nitric oxide synthase isozymes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**:2881-2885.
21. **Jenal, U., and R. Hengge-Aronis.** 2003. Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:163-172.
22. **Jensen, R. A., and W. Gu.** 1996. Evolutionary recruitment of biochemically specialized subdivisions of Family I within the protein superfamily of aminotransferases. *J. Bacteriol.* **178**:2161-71.
23. **Keane, P. J., A. Kerr, and P. B. New.** 1970. Crown gall of stone fruit. 2. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.* **23**:585-590.
24. **Kers, J. A., M. J. Wach, S. B. Krasnoff, J. Widom, K. D. Cameron, R. A. Bukhalid, D. M. Gibson, B. R. Crane, and R. Loria.** 2004. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* **429**:79-82.
25. **King, E. O., M. S. K. Ward, and D. E. Raney.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**:301-307.
26. **Kitten, T., T. G. Kinscherf, J. L. McEvoy, and D. K. Willis.** 1998. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **28**:917-29.
27. **Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd, and K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-

- range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-6.
28. **Llama-Palacios, A., E. López-Solanilla, C. Poza-Carrion, F. García-Olmedo, and P. Rodríguez-Palenzuela.** 2003. The *Erwinia chrysanthemi* *phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. *Mol. Microbiol.* **49**:347-357.
 29. **Lu, S. E., N. Wang, J. Wang, Z. J. Chen, and D. C. Gross.** 2005. Oligonucleotide microarray analysis of the *salA* regulon controlling phytotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**:324-33.
 30. **Mahlert, C., F. Kopp, J. Thirlway, J. Micklefield, and M. A. Marahiel.** 2007. Stereospecific enzymatic transformation of alpha-ketoglutarate to (2*S*,3*R*)-3-methyl glutamate during acidic lipopeptide biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **129**:12011-12018.
 31. **May, R., B. Völksch, and G. Kampmann.** 1997. Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* *in vitro* and *in planta*. *Microb. Ecol.* **34**:118-124.
 32. **Miller, S. I., and J. J. Mekalanos.** 1990. Constitutive expression of the *phoP* regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J. Bacteriol.* **172**:2485-90.
 33. **Murillo, J., H. Shen, D. Gerhold, A. Sharma, D. A. Cooksey, and N. T. Keen.** 1994. Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23. *Plasmid* **31**:275-87.
 34. **Page, R. D.** 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**:357-358.
 35. **Palmer, D. A., and C. L. Bender.** 1993. Effects of environmental and nutritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1619-1626.
 36. **Prithivirajsingh, S., S. K. Mishra, and A. Mahadevan.** 2001. Functional analysis of a chromosomal arsenic resistance operon in *Pseudomonas fluorescens* strain MSP3. *Mol. Biol. Rep.* **28**:63-72.
 37. **Raaijmakers, J. M., I. de Bruijn, and M. J. de Kock.** 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**:699-710.

38. **Rogers, Y. C., A. C. Munk, L. J. Meincke, and C. S. Han.** 2005. Closing bacterial genomic sequence gaps with adaptor-PCR. *BioTechniques* **39**:31-34.
39. **Rosenstein, R., K. Nikoleit, and F. Gotz.** 1994. Binding of ArsR, the repressor of the *Staphylococcus xylosus* (Psx267) arsenic resistance operon to a sequence with dyad symmetry within the *ars* Promoter. *Mol. Gen. Genet.* **242**:566-572.
40. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
41. **Scholz-Schroeder, B. K., M. L. Hutchison, I. Grgurina, and D. C. Gross.** 2001. The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of *sypA* and *syrB1* biosynthesis mutant analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:336-348.
42. **Shoda, M.** 2000. Bacterial control of plant diseases. *J. Biosci. Bioeng.* **89**:515-21.
43. **Soncini, F., E. Vescovi, F. Solomon, and E. Groisman.** 1996. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: Identification of PhoP-regulated genes. *J. Bacteriol.* **178**:5092-5099.
44. **Takaya, A., F. Tabuchi, H. Tsuchiya, E. Isogai, and T. Yamamoto.** 2008. Negative regulation of quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* by ATP-dependent Lon protease. *J. Bacteriol.* **190**:4181-4188.
45. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876-82.
46. **Völksch, B., J. Nüske, and R. May.** 1996. Characterization of two epiphytic bacteria from soybean leaves with antagonistic activities against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Basic Microbiol.* **36**:453-462.
47. **Wang, N., S. E. Lu, J. Wang, Z. J. Chen, and D. C. Gross.** 2006. The expression of genes encoding lipodepsipeptide phytotoxins by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is coordinated in response to plant signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**:257-69.
48. **Wilson, K. J., A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, A. D. L. Akkermans, and R. A. Jefferson.** 1995. Beta-glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic-studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **141**:1691-1705.

LEGENDS

FIG. 1.

3-Methylarginine biosynthesis gene cluster from *P. syringae* pv. *syringae* 22d/93: *mrsA* (FJ788104), *mrsB* (FJ788104), and *mrsC* (FJ788104) genes coding for a SAM-dependent methyltransferase, a aminotransferase, and a 3-methylarginine exporter, respectively. The lines below the physical map represent conserved domains identified by BLASTP search. The insertion site of the mini-Tn5 in the *mrsA* gene of the Pss22d.1 mutant is indicated by an arrowhead (▼). Predicted sites for putative promoters were analyzed by the BPROM software and are also indicated by arrowheads (◄). The size and homology of the ORFs is given.

FIG. 2.

(A) Sequence alignment of the aminotransferase superfamily I. Abbreviations and accession numbers: Pss22d AT, *P. syringae* pv. *syringae* 22d/93, aminotransferase MrsB (FJ788104); PssB728a AT, *P. syringae* pv. *syringae* B728a, aminotransferase psyr_117 (YP_233229); Aac AT, *A. avenae* subsp. *citrulli*, aminotransferase (YP_972027); Eco TyrB, *E. coli*, aromatic aminotransferase (X03628); Eco HisC, *E. coli*, IAP aminotransferase (P06986); Rme AspA, *Rhizobium meliloti*, aspartate aminotransferase A (L05064); Rme AspB, *Rhizobium meliloti*, aspartate aminotransferase B (L12149).

(B) Dendrogram of the class I aminotransferases superfamily generated by ClustalX multiple alignment program. The primary functions of each aminotransferase are indicated (right). Abbreviations and accession numbers: Rme Tyr, *Rhizobium meliloti*, aromatic aminotransferase (L05065); Pae PhhC, *Pseudomonas aeruginosa*, aromatic aminotransferase (M88627); Eco AspC, *E. coli*, aspartate aminotransferase (X03629); Eco TyrB, *E. coli*, aromatic aminotransferase (X03628); Msa Asp2, *Medicago sativa*, aspartate aminotransferase (AAB46611); Alf Asp1, alfalfa, aspartate aminotransferase 1 (P28011); Rat AspM, rat, mitochondrial aspartate aminotransferase (M18467); Rat AspC, rat, cytosolic aspartate aminotransferase (J04171); Sty HisC, *Salmonella typhimurium*, HisC (J01804); Eco HisC, *E. coli*, IAP aminotransferase (P06986); Bsu HisH, *Bacillus subtilis*, IAP aminotransferase (P17731); Zmo HisH, *Zymomonas mobilis*, IAP aminotransferase (L36343); Hvo HisH, *Haloferax volcanii*, IAP aminotransferase (M33161); Lla HisC, *Lactococcus lactis*, IAP aminotransferase (M90760); Sce His5, *Saccharomyces cerevisiae*, IAP aminotransferase (X05650); Cgl His, *Corynebacterium glutamicum*, histidine biosynthesis (AY238320); Rme AspA, *Rhizobium meliloti*, aspartate aminotransferase A

(L05064); Rme AspB, *Rhizobium meliloti*, aspartate aminotransferase B (L12149); Bsp Asp, *Bacillus spec.*, aspartate aminotransferase (P23034); Sso Asp, *Sulfolobus solfataricus*, aspartate aminotransferase (X16505); Cgl 2877, *Corynebacterium glutamicum*, purine synthesis (AY238316); Rat Tyr, rat, tyrosine aminotransferase (X02741); Cgl DapC, *Corynebacterium glutamicum*, lysine biosynthesis (AY170830); Cgl IlvE, *Corynebacterium glutamicum*, IlvE (AF424637).

FIG. 3.

Multiple sequence alignment of RhtB and LysE amino acid transporters. Both subfamilies are members of the LysE superfamily and differ in the shown motifs. Abbreviations of the exporters and accession numbers: Pss22d Exp, *P. syringae* pv. *syringae* 22d/93, MrsC (FJ788104); PssB728a Exp, *P. syringae* pv. *syringae* B728a, lysine exporter protein LysE/YggA (YP233228); Ec YeaS, *E. coli*, neutral amino-acid efflux system (NP416312); Pa YcaR, *Pseudomonas aeruginosa*, leucine export protein (NP253445); Ec RhtC, *E. coli*, threonine efflux system (YP026264); Ps CmaU, *Pseudomonas syringae*, biosynthesis of coronamic acid (AAC46034); Ah YggA, *Aeromonas hydrophila*, putative amino-acid transporter yggA (P52047); Ec YggA, *E. coli*, arginine exporter protein (NP289490).

FIG. 4.

Agar diffusion bioassays with the indicator strains *P. syringae* pv. *glycinea* 1a/96 sensitive to 3-methylarginine (A) without L-arginine and (B) with 0.1 mM L-arginine.

FIG. 5.

(A) SDS-PAGE of the SAM-dependent methyltransferase MrsA involved in 3-methylarginine biosynthesis; (B) ESI-MS and (C) deconvoluted mass of the methyltransferase MrsA.

FIG. 6.

Conversion of 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid into 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid by the SAM-dependent methyltransferase MrsA. (A) Reaction scheme, (B) LC-MS ion traces m/z 114 and m/z 128, and (C) ESI-MS/MS of 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid and 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid.

FIG. 7.

Suggested biosynthetic pathway of 3-methylarginine formation in Pss22d

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strains	Relevant characteristics	Source
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Pss)		
Pss22d	wild type, isolated from soybean	(46)
Pss22d.1	Sp ^r , transposon mutant of Pss22d, Tn5 insertion in methyltransferase gene <i>mrsA</i>	(6)
Pss22d.2, Pss22d.3, Pss22d.6, Pss22d.7, Pss22d.8	Sp ^r , Tn5 transposon mutants of Pss22d	this study
Pss22d.1C	Sp ^r , Km ^r , Pss22d.1 harboring plasmid pB3150 for complementation of MeArg production	this study
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Psg)		
Psg1a/96	wild type, isolated from soybean	(46)
<i>Escherichia coli</i> (Ec)		
Ec2795	DH5α containing plasmid pG2795	this study
Ec3150	DH5α containing plasmid pG3150	this study
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(17)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , λ (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> S17-1λpir	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> -M ⁺ , RP4:2-Tc:Mu:Km Tn7, λpir, Tp ^r , Sm ^r	(48)
Plasmids		
pMKm	source of Km ^r cassette	(33)
pGEM-T Easy	cloning vector, Ap ^r	Promega
pJet 1.2	cloning vector, Ap ^r	Fermentas
pBBR1MCS	cloning vector, Cm ^r	(27)
pET28b(+)	cloning vector, Km ^r	Novagen
pUT/mini-Tn5 Sm/Sp	Sm ^r ; Sp ^r ; Ap ^r , contains mini-Tn5	(10)
pG2795	Ap ^r , contains a 2,795-bp fragment carrying the MeArg biosynthesis cluster of Pss22d without the exporter gene <i>mrsC</i> in pGEM-T Easy	this study
pJ2795	Ap ^r , contains a 2,795-bp fragment carrying the MeArg biosynthesis cluster without the exporter gene <i>mrsC</i> in pJet 1.2	this study
pG1342	Ap ^r , contains a 1,343-bp adapter-PCR fragment carrying a part of the exporter gene <i>mrsC</i> of Pss22d in pGEM-T Easy	this study
pJ3150	Ap ^r , contains a 3,150-bp PCR fragment carrying the MeArg biosynthesis cluster of Pss22d in pJet 1.2	this study
pG3150	Ap ^r , contains a 3,150-bp PCR fragment carrying the MeArg biosynthesis cluster of Pss22d in pGEM-T Easy	this study
pB3150	Cm ^r , contains a 3,150-bp PCR fragment carrying the MeArg biosynthesis cluster of Pss22d in pBBR1MCS	this study
pET28b(+)-MrsA	Km ^r , contains a 1,053-bp PCR fragment carrying the methyltransferase gene <i>mrsA</i> of Pss22d	this study

TABLE 2. Characterization of six transposon mutants from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 affected in 3-methylarginine production. Comparison of the flanking regions of the miniTn5 insert with sequenced genomes of *Pseudomonas syringae* pathovares and characterization of the complemented strains.

	3-Methylarginine ($\mu\text{g/ml}$) ^e			Growth (OD _{578nm})		SM ^c	SP ^d	Predicted function ^e	Identity (%) ^f	Organism	Accession No.
	24 h	24 h +arginine ^b	24 h	24 h	24 h						
Pss22d (WT)	74.7 \pm 0.0	13.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	7.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	+	+	-	-	<i>P. s. pv. syringae</i> 22d/93	-
Pss22d.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	7.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	+	+	SAM-dependent methyltransferase	94	<i>P. s. pv. syringae</i> B728a	FJ788104
Pss22d.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	5.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	-	+	PhoQ	89	<i>P. s. pv. phaseolicola</i> 1448A	FJ788106
Pss22d.3	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	5.7 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	-	+	GacS	94	<i>P. s. pv. phaseolicola</i> 1448A	FJ788105
Pss22d.6	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	5.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	-	+	ArsR	94	<i>P. s. pv. syringae</i> B728a	FJ788102
Pss22d.7	441.9 \pm 63.6	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	6.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	++	+/- ^g	ATP-dependent protease	93	<i>P. s. pv. syringae</i> B728a	FJ788101
Pss22d.8	390.4 \pm 111.6	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	6.9 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	++	+/- ^g	ORF 3	86	<i>P. s. pv. syringae</i> UMAF0158	FJ788103
Pss22d.1C	61.1 \pm 5.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	8.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	+	+	-	-	<i>P. s. pv. syringae</i> 22d/93	-
Ec2795	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	2.9 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	-	-	-	-	<i>E. coli</i> DH5 α (pG2795)	-
Ec3150	4.3 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	3.0 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	-	-	-	-	<i>E. coli</i> DH5 α (pG3150)	-

^a Concentration was estimated by a standard curve (6).

^b 5b media supplemented with 0.1 mM L-arginine.

^c SM - syringomycin halo: + = like wild type; ++ = overproduction; - = no production.

^d SP - syringopeptin halo: + = like wild type; - = no production.

^e Predicted function of the disrupted gene.

^f Identity at nucleotide level.

^g A small inhibition zone was visible due to the sensitivity of *Bacillus megaterium* Km against syringomycin.

Figure 1

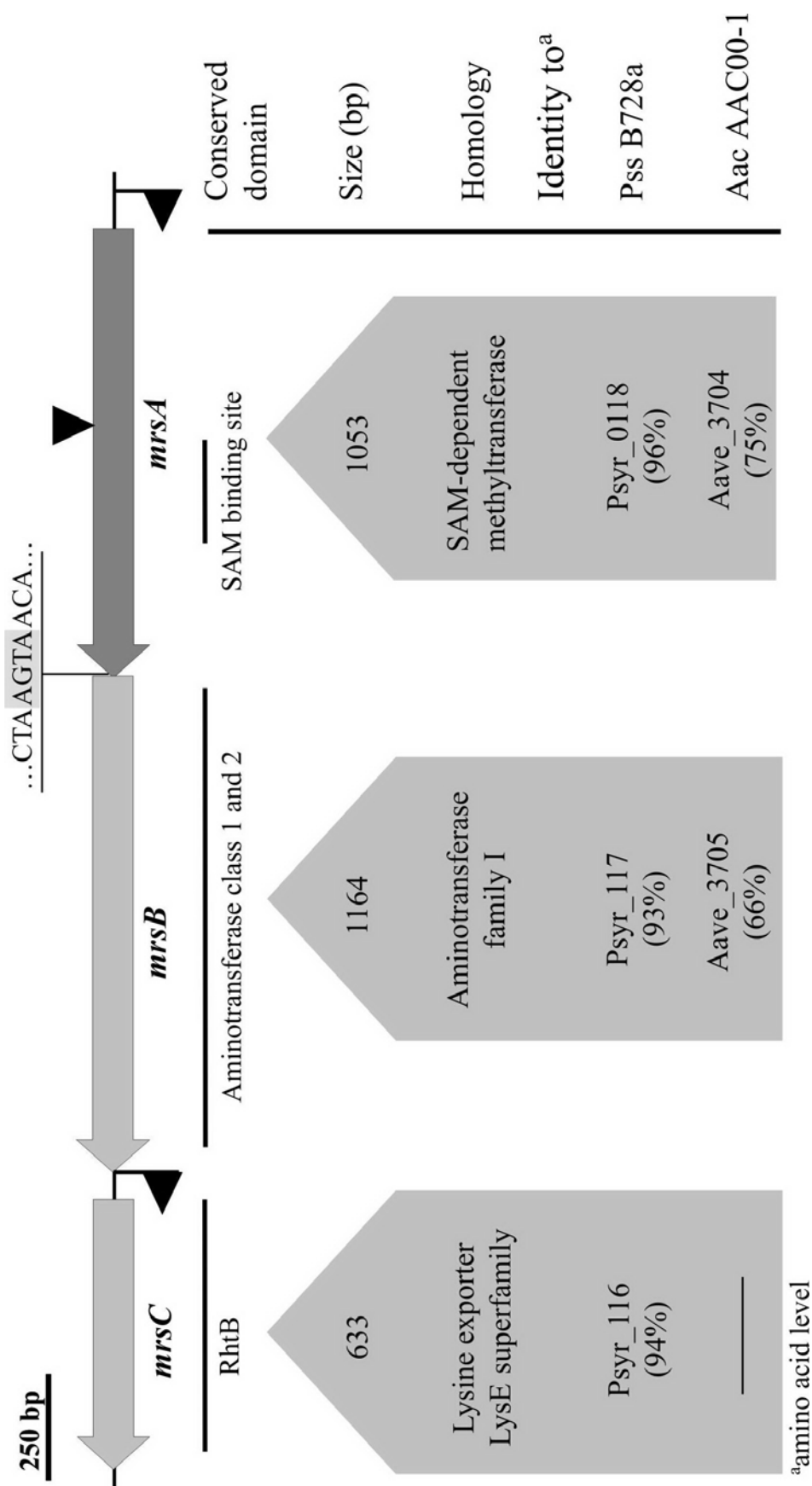
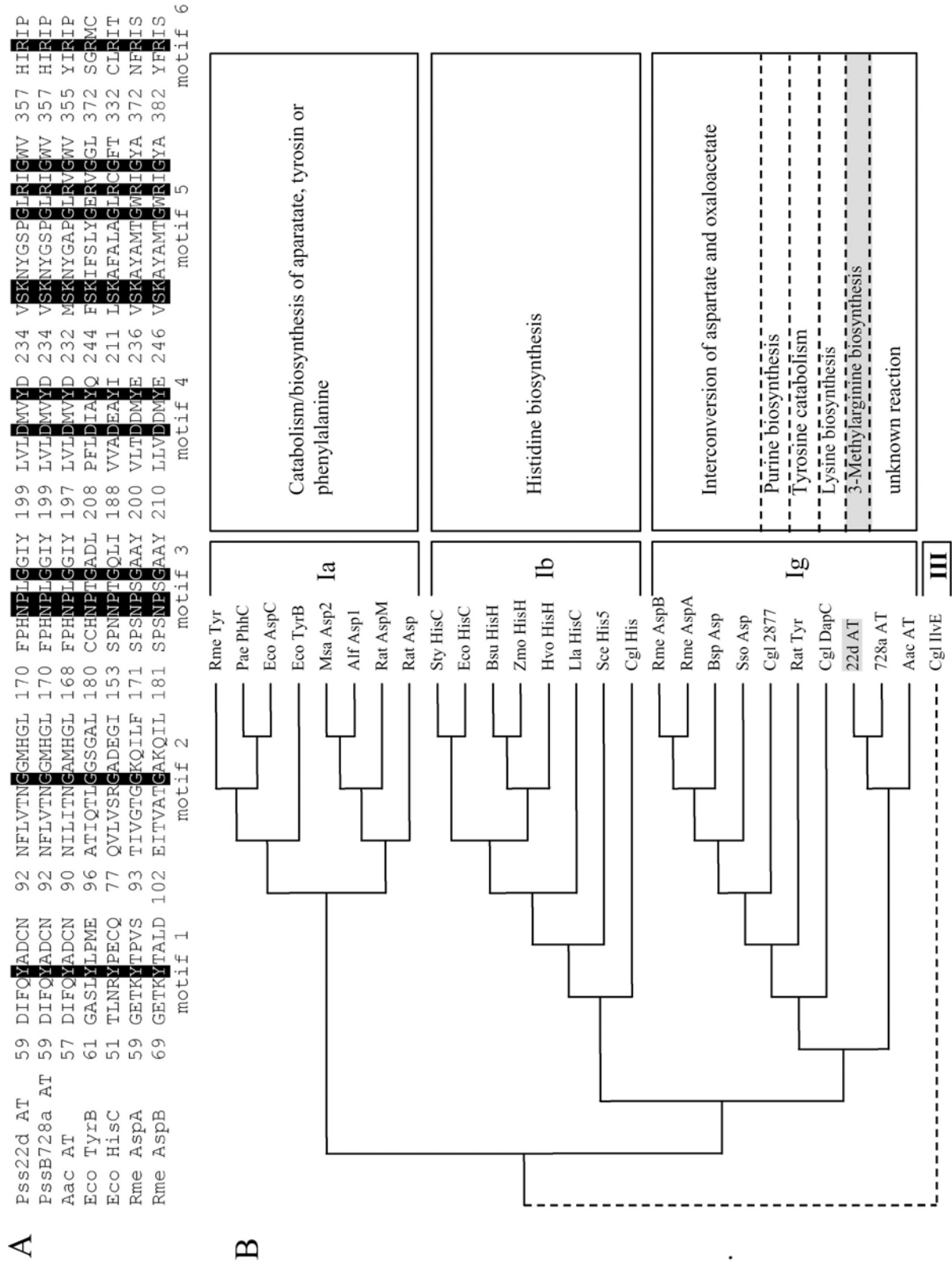


Figure 2



67

Figure 4

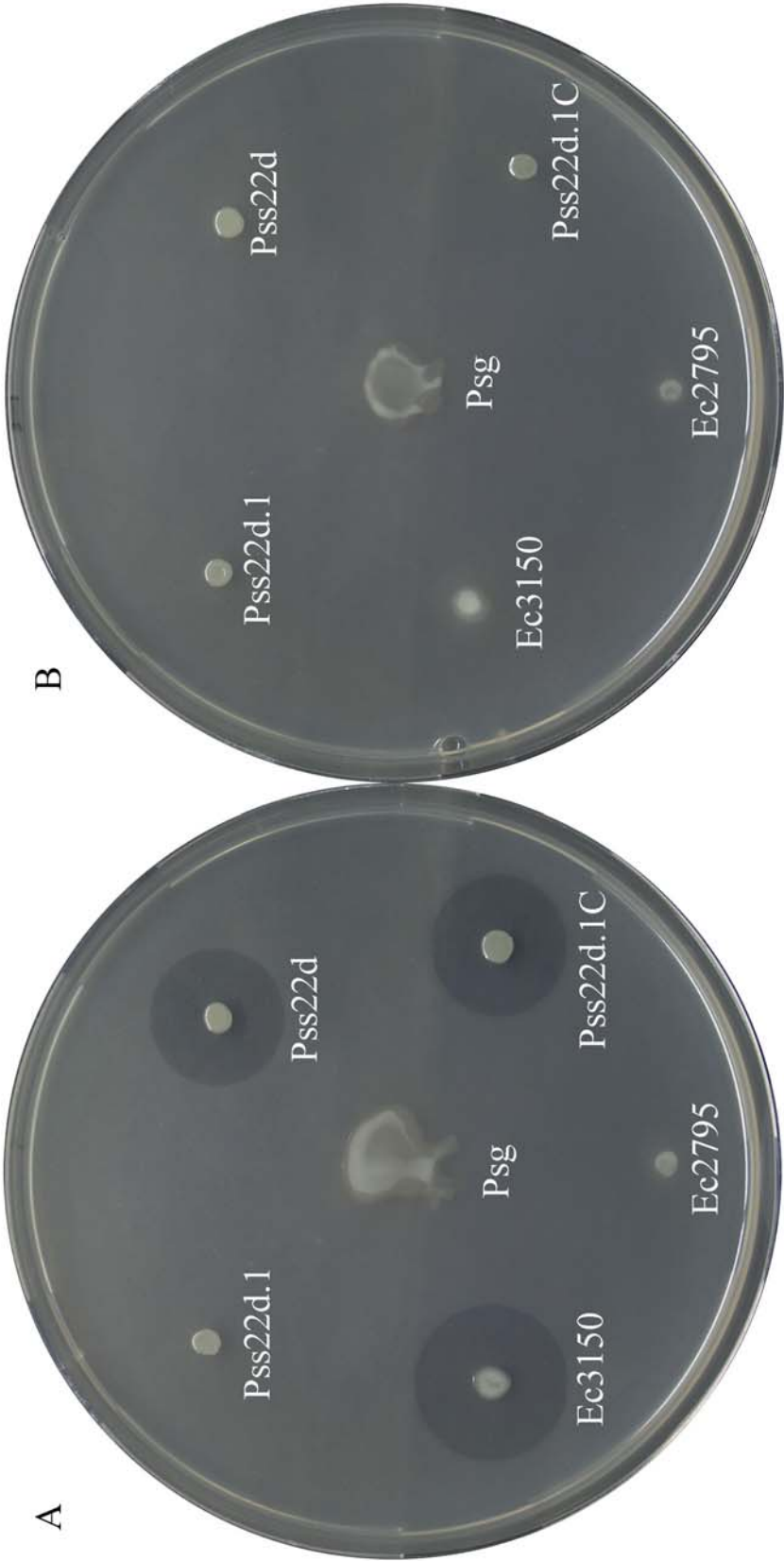


Figure 5

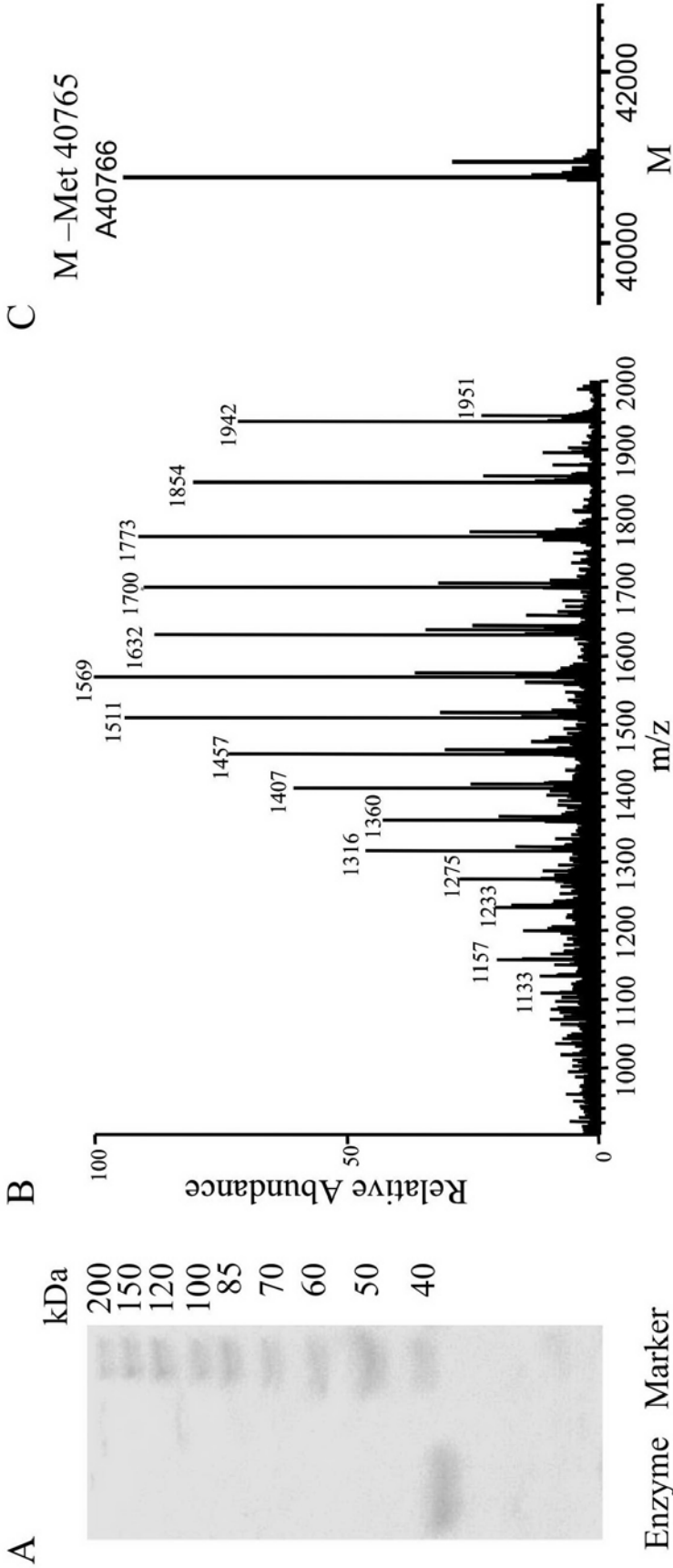


Figure 6

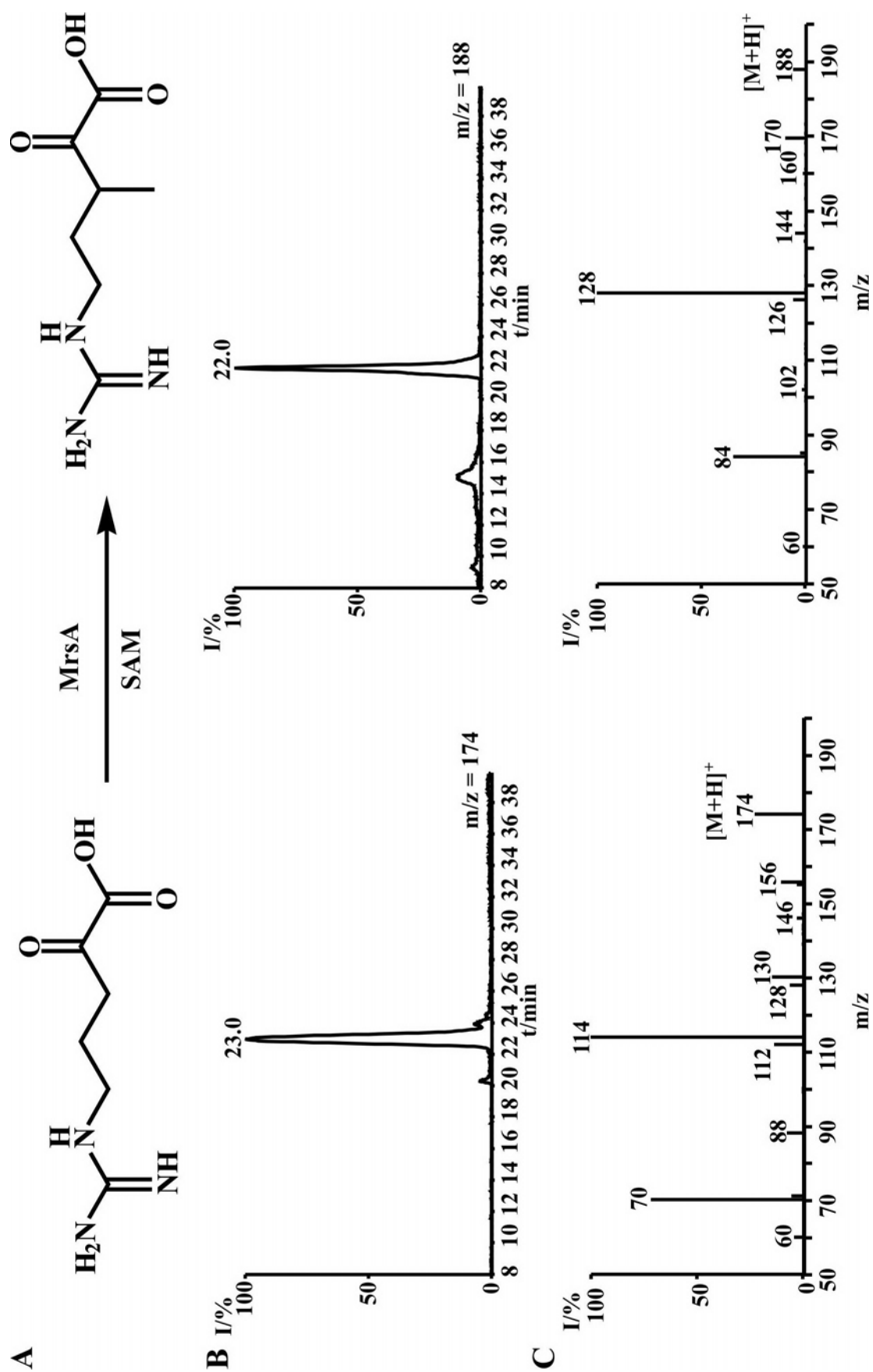
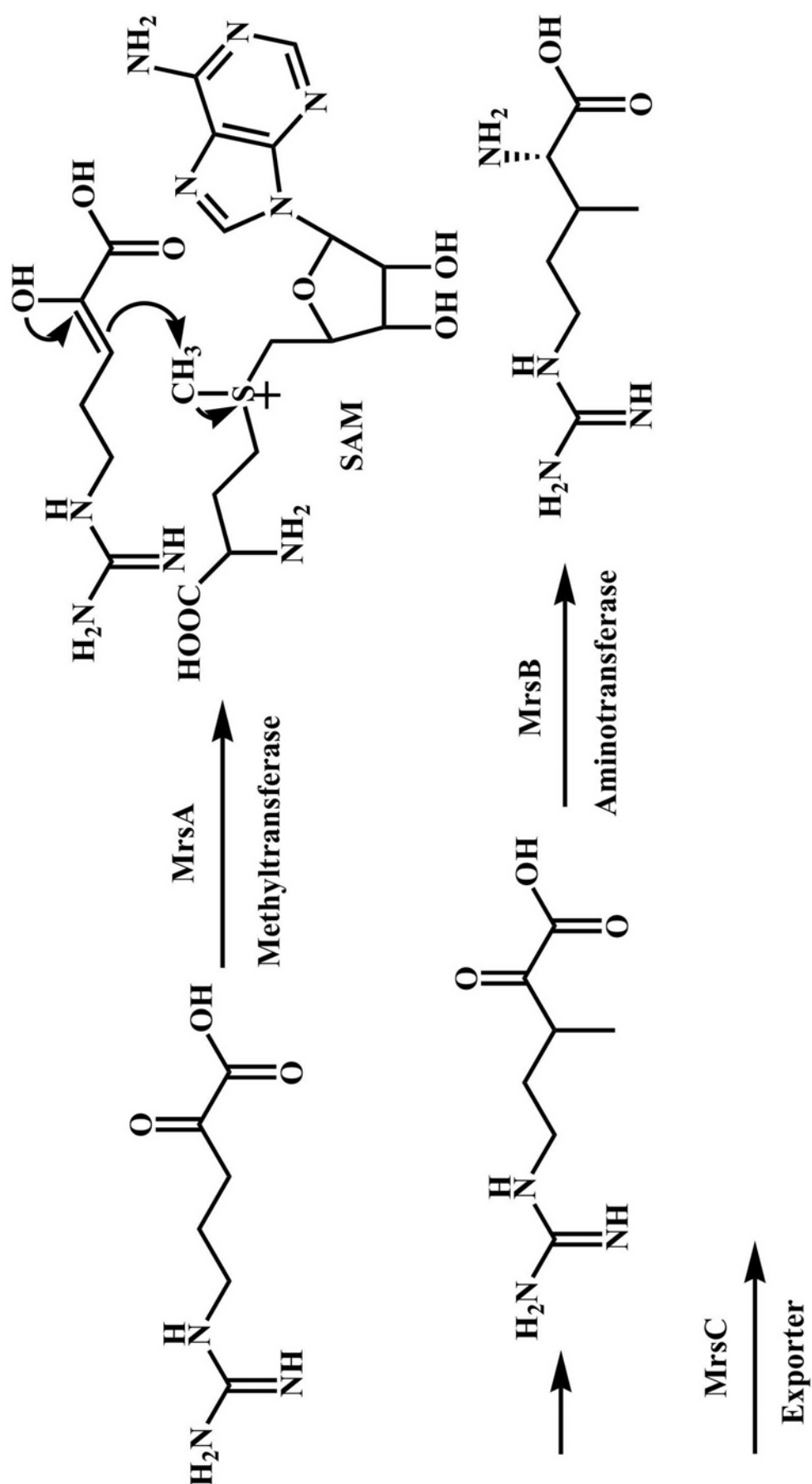


Figure 7



3.3. Manuskript III

Braun, S. D., J. Hofmann, A. Wensing, H. Weingart, M. S. Ullrich, D. Spiteller, and B. Völksch

In vitro antibiosis by *Pseudomonas syringae* Pss22d, acting against the bacterial blight pathogen of soybean plants, does not influence *in planta* biocontrol.

eingereicht bei: Journal of Phytopathology

Institute of Microbiology, Microbial Phytopathology, University of Jena, Jena, Germany

***In vitro* antibiosis by *Pseudomonas syringae* Pss22d, acting against the bacterial blight pathogen of soybean plants, does not influence *in planta* biocontrol**

S. D. BRAUN¹, J. HOFMANN¹, A. WENSING², H. WEINGART², M. S. ULLRICH², D. SPITELLER³, B. VÖLKSCH¹

Authors' addresses: ¹Institute of Microbiology, Microbial Phytopathology, University of Jena, Neugasse 25, 07743 Jena (Germany), ²Jacobs University Bremen, School of Engineering and Science, Campusring 1, 28759 Bremen (Germany), ³Max Planck Institute for Chemical Ecology, Bioorganic Chemistry, Hans-Knöll-Strasse 8, 07745 Jena (Germany) (correspondence to S. D. Braun E-mail: sascha.braun@uni-jena.de)

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, 3-methylarginine, biocontrol, antagonism, soybean, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Running title: Antibiosis by *P. syringae* does not influence biocontrol

Abstract

The epiphyte *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d), isolated from soybean leaves, had been characterized as a promising and species-specific biocontrol strain *in vitro* and *in planta* against the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg), which causes bacterial blight of soybean. Three toxins are known to be produced by Pss22d: syringomycin, syringopeptin, and 3-methylarginine. In contrast to syringopeptin and syringomycin, 3-methylarginine inhibited the growth of Psg *in vitro*. To examine if the toxins produced by Pss22d are responsible for antagonistic effects *in planta*, the pathogen Psg was coinoculated with either Pss22d wild-type, a syringopeptin/syringomycin-negative double mutant (Pss22d.ΔsypA/syrE), or a 3-methylarginine-negative mutant (Pss22d.1) into wounds of pin-pricked leaves of greenhouse soybean plants, respectively. In all three cases, the wild-type Pss22d and its toxin-deficient mutants prevented development of disease symptoms normally caused by Psg. These results indicated that neither syringopeptin, nor syringomycin, nor 3-methylarginine was required for Pss22d's antagonistic activity *in planta*. Consequently, factors other than the three toxins may contribute to the intra-species antagonism *in planta*.

Introduction

Bacterial blight caused by the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg) (Coerper 1919) is the most important prokaryotic leaf spot disease in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Since conventional pesticide treatment is costly and causes serious environmental problems, a more ecological way to fight plant pathogens is required. Thus, the use of organisms that interfere with agricultural pests gained significant attention in recent years (Andrews 1992; Paulitz and Belanger 2001; Janisiewicz and Korsten 2002; Haas and Defago 2005).

Although detailed molecular mechanisms by which biocontrol strains suppress the development of their target organisms are not well understood, several general principles for these interactions have been deduced: Biocontrol agents may compete for limited resources such as nutrients or space (Johnson and Stockwell 1998) thus forcing pathogens to starve or preventing them from entry into leaf tissue (Stromberg *et al.* 2000). In particular, competition for iron by siderophores was thought to be crucial for interactions within mixed microbial communities (Thomashow 1996). Induced systemic resistance (ISR) in the host plant, mediated by e.g. lipopolysaccharides, siderophores or salicylic acid, comprises another major mechanism of biocontrol (van Loon *et al.* 1998; Heil and Bostock 2002; Lugtenberg *et al.* 2002). Alternatively, interference with the pathogen's quorum-sensing system by the antagonist may efficiently impact development of pathogenicity. For example, Dong *et al.* (2004) described a quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* that degrades *N*-acylhomoserine lactones, the signal substances of many Gram-negative bacteria (Williams 2007). Finally, the most direct mechanism of antagonistic behavior is the production of toxins (antibiosis) that block pathogen growth (Dowling and Ogara 1994; Raaijmakers *et al.* 2002). For example, phenazines produced by *Pseudomonas aeruginosa* prevent the development of *Fusarium* wilt of chickpea (Anjaiah *et al.* 1998). For *Pseudomonas fluorescence* strains Q2-87 and Q8r1-96 antibiosis mediated by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) production was reported as the principal antagonistic mechanism against take-all disease of wheat (Vincent *et al.* 1991; Raaijmakers and Weller 2001).

A comprehensive screening among epiphytes from soybean leaves for putative biocontrol agents against the soybean pathogen Psg yielded *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d) (Völksch *et al.* 1996). This strain efficiently and selectively inhibited the pathogenesis of its close relative Psg *in vitro* and *in planta* under greenhouse and field conditions (May *et al.* 1997; Völksch and May 2001). Generally, *P. syringae* pv.

syringae strains are known for their capability to produce secondary metabolites with antibiotic potential (Carpaneto *et al.* 2002; Fogliano *et al.* 2002; Grgurina *et al.* 2002). Pss22d produces two lipodepsipeptides, syringomycin and syringopeptin (Völksch *et al.* 1996), and the unusual amino acid 3-methylarginine (MeArg) (Braun *et al.* 2008). 200 ng MeArg inhibited the growth of Psg *in vitro*. This inhibition could be compensated for by L-arginine, suggesting that the toxin interferes with arginine biosynthesis or an arginine-dependent pathway (Braun *et al.* 2008).

In vitro studies are suitable to identify promising biocontrol agents and to characterize toxic principles (Raaijmakers *et al.* 2002; Cirvilleri *et al.* 2005). However, *in planta* experiments are necessary to evaluate the biocontrol strain under natural conditions (Yuen *et al.* 2001; Adikaram *et al.* 2002). The so-called ‘pin-prick’ technique is frequently used for *in planta* studies of antagonist-pathogen interactions (May *et al.* 1997). This method mimics the natural infection process by which bacteria often enter a plant through open wounds. One advantage of this method is that a defined number of bacterial cells can be used to inoculate the pin-pricked wounds.

Antibiotics-negative mutants have often been used in order to determine whether antibiosis contributes to the mode of interaction between a specific antagonist and pathogen *in vitro* and *in planta* (Clarkson and Lucas 1997; Li *et al.* 2008). Here, mutational analysis was applied to evaluate the potential role(s) of the secondary metabolites syringomycin, syringopeptin and MeArg produced by Pss22d in the antagonism to the pathogen Psg *in vitro* and *in planta*.

Materials and Methods

Bacterial strains, media and plasmids

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d) was isolated from a symptom-free soybean leaf (Völksch *et al.* 1996). *P. syringae* strains were cultured and maintained on King’s B agar (King *et al.* 1954) at 28 °C. *Escherichia coli* strain DH5α was used as a cloning host and was cultured and maintained on Standard 1 agar (Merck) at 37 °C.

DNA manipulation

All primers used in this study are listed in Table 1. The syringopeptin- and syringomycin-negative double mutant Pss22d.ΔsypA/syrE was constructed using a marker

exchange strategy inactivating the genes *sypA* and *syrE*, respectively. For each gene a left and right flanking fragment (*sypA*: fragment AB and CD; *syrE*: fragment EF and GH) was obtained by PCR (Fig. 1). The primers were modified with restriction sites on the 5'-end for directed cloning and insertion of the resistance cassettes. PCR products were cloned into the vector pGEM-T Easy, yielding plasmids pGEM.AB, pGEM.CD, pGEM.EF, and pGEM.GH. The *sypA* knock-out vector was generated as follows: A 1282-kb *XbaI-SpeI* fragment cut from pGEM.CD was ligated into *XbaI-SpeI*-digested pGEM.AB, yielding the plasmid pGEM.Δ*sypA*. The kanamycin resistance gene cassette (*kanR*) cut from pMKm by *XbaI* was ligated into *XbaI*-digested pGEM.Δ*sypA*, yielding plasmid pGEM.Δ*sypA*-Km. The *syrE* knock-out vector was generated as follows: A 2242-kb *HindIII-SpeI* fragment cut from pGEM.EF was ligated into *HindIII-SpeI*-digested pGEM.GH, yielding the plasmid pGEM.Δ*syrE*. The spectinomycin resistance gene cassette (*aadA7*) cut from pUT/mini-Tn5 Sm/Sp by *HindIII* was ligated into *HindIII*-digested pGEM.Δ*syrE*, yielding the plasmid pGEM.Δ*syrE*-Sp.

The suicide vectors, pGEM.Δ*sypA*-Km and pGEM.Δ*syrE*-Sp, were transferred into electrocompetent cells of Pss22d and transformants were selected on Kings B agar plates containing spectinomycin (25 mg/l) and kanamycin (25 mg/l). PCR analysis using primers binding within the resistance cassettes and outside of the gene fragments used to generate the suicide vectors revealed that the native alleles of *syrE* and *sypA* were replaced by the homologous integration of the Sm/Sp^r and Km^r cassettes, respectively (Fig. 1). The MeArg-negative mutant Pss22d.1 was generated by Tn5 mutagenesis as described by Braun *et al.* (2008).

Agar diffusion assays and standard curve

The production by syringomycin and syringopeptin of Pss22d and its mutants was determined by agar diffusion assays with *Geotrichum candidum* and *Bacillus megaterium* as indicator strains, respectively (Scholz-Schroeder *et al.* 2001). MeArg production was screened for in an agar diffusion assay against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* strain 1a/96 (Psg1a) described by Braun *et al.* (2008). In order to generate a standard curve and determine the minimal inhibition concentration, purified MeArg (dilution series: 0.2-2000 µg/ml) was used in three replicates. The standard curve was used to calculate the concentration of MeArg in individual experiments.

Growth curve and toxin production

The growth curves of Pss22d and its mutants in HSC liquid medium (Palmer and Bender 1993) were determined in three parallels (100 ml medium, 200 rpm, 28 °C). The cultures were inoculated using an overnight pre-culture to yield approximately 7×10^7 cfu/ml. Bacterial growth was analyzed every 6 h by measuring the OD_{578nm}. Samples for analyzing MeArg production were taken every 24 h.

In planta experiments

Young trifoliolate leaves of 10- to 14-d-old greenhouse-grown soybean plants (cv. Maple Arrow) were used for the *in planta* assays. Plants were kept in a growth chamber with a 14-h photo period (25 °C, 80 % humidity) and a 10-h dark period (20 °C, humidity 50 %). Cell suspensions of Pss22d, Pss22d.ΔsypA/syrE, Pss22d.1 and Psg1a (10^6 cfu/ml in distilled water supplemented with 0.001 % Tween80) were prepared using 24-h-old cultures grown on King's B agar plates. The cell suspension of Pss22d and its mutants were mixed with the cell suspension of Psg1a at a ratio of 2:1 (v/v). As control, the suspensions of Pss22d, its mutants, and Psg1a were separately mixed with sterile water in the same ratio. The leaflets were inoculated by the pinprick technique (May *et al.* 1997). For each mixture 15 inoculation sites (5 per leaflet) were generated on different plants. After inoculation, the development of the bacterial populations (May *et al.* 1997) was monitored 12 h, 7 d, 14 d, 21 d and 28 d.

In planta assays with purified MeArg were conducted as follows: 3 d after pinprick inoculation of soybean leaves with Psg1a, 5 µl of MeArg solution (300 ng, 20 ng, and water as control) was placed on the infected wounds. This procedure was repeated at days 6 and 9. The wounds were moistened daily with 5 µl water. For each concentration, 15 wounds (5 per leaflet) were investigated on different plants. Density of the bacterial populations was determined before the first inoculation with MeArg, and always 1 d after inoculation. An additional sample was taken after 21 d to assess the effect after a long time period.

For dip inoculation, three-week-old plants were used in three replicates. Cell suspensions of Pss22d and Psg1a were prepared from HSC liquid cultures, which were incubated for 24 h at 28 °C. After centrifugation at 4000 rpm, the cells were washed twice with sterile deionized water and resuspended in water that had a concentration of approximately 10^5 cfu/ml. The Pss22d suspension was mixed with the Psg1a suspension or water in a 2:1 (v/v) ratio. Sterile deionized water was used as control. Plants were

completely dipped in each bacterial suspension and water for 20 min. The population development of the strains and MeArg production of Pss22d was observed after 14 d. All soybean leaves of each treatment were weighed, macerated and taken up in 150 ml sterile deionized water. 1 ml was used to determine the population size per gram fresh weight (cfu/g FW). The homogenates were centrifuged to remove leaf particles and the supernatant was dried, redissolved in 4 ml deionized water, and MeArg was purified using ion exchange chromatography (Braun *et al.*, 2008). MeArg production was quantified by the agar diffusion assay.

Statistical analysis

Data management and computation were performed using Microsoft Excel software (Microsoft Corporation). The means and the standard deviations were calculated and statistical compared by t-test using SigmaStat 2.03 (SPSS Inc.). For *in planta* assays with purified MeArg, any changes in mean population size of Psg were tested by one way ANOVA (GLM) using SPSS 16.0 (SPSS Inc.) and differences between treatments were identified using a Bonferroni post-hoc tests.

Results

3-methylarginine standard curve

The diameters of inhibition zones observed in agar diffusion assay with Psg1a as an indicator strain were correlated to the logarithm of MeArg concentration. The regression of the standard curve was described by the following function: $y = 6.9261 \cdot \ln(x) + 3.8611$. The regression used had an R^2 greater than 0.95 and a significance level of $p < 0.05$. 3 μ g MeArg produced inhibition zones approximately 33 mm in diameter. An inhibition zone of 15 mm equivalent to 200 ng MeArg was upper the threshold limit of this bioassay.

Characterization of Pss22d mutants

The wild-type Pss22d produced clear inhibition zones in all *in vitro* bioassays with the indicator organisms *G. candidum* (sensitive to syringomycin), *B. megaterium* (sensitive to syringopeptin) and Psg1a (sensitive to MeArg) (Fig. 2a-c). The syringopeptin/syringomycin-negative mutant Pss22d. Δ sypA/syrE did not inhibit the growth of the indicator strains *G. candidum* and *B. megaterium* (Fig. 2b, c). In contrast, this mutant inhibited growth of Psg1a comparable to the wild-type Pss22d (Fig 2a). These results confirmed the genotype of the double mutant and confirmed that neither

syringopeptin nor syringomycin is required to inhibit the growth of Psg1a *in vitro*. However, the MeArg-negative mutant Pss22d.1 did not inhibit the growth of Psg1a (Fig 2a) but clearly inhibited the growth of *G. candidum* and *B. megaterium* (Fig. 2b, c) confirming earlier results, which had shown that MeArg was required for the *in vitro* inhibition of Psg1a growth by Pss22d (Braun *et al.* 2008).

Growth curves of the Toxin-negative mutants in HSC liquid medium indicated no differences between any of the mutants and the wild-type Pss22d (Fig. 3). Moreover, the amount of MeArg produced by mutant Pss22d. Δ sypA/syrE was similar to that produced by the wild-type (t-test, $p < 0.05$). As expected and as previously shown, Pss22d.1 did not produce MeArg (Fig. 3) (Braun *et al.* 2008).

Development of *in planta* population sizes in single and co-inoculation experiments

In order to assess the antagonistic potential of Pss22d and its toxin-deficient mutants *in planta*, co-inoculation experiments using the pin-prick technique (May *et al.* 1997) were conducted. As expected, a single inoculation of Psg1a caused typical symptoms (necrotic spots surrounded by chlorotic haloes) approximately 7 d after inoculation. At this time, the population size of Psg1a reached 10^8 – 10^9 cfu/wound. After 28 d the population size of Psg1a reached 10^{10} cfu/wound (Fig. 4a-c, dotted line). The wild-type Pss22d and the mutants, Pss22d. Δ sypA/syrE and Pss22d.1, developed stable *in planta* populations on the leaves with 10^3 – 10^4 cfu/wound after 7 d without causing any disease symptoms (Fig. 4a-c, dotted line).

A fundamentally different picture arose from the analysis of the three co-inoculation experiments. When the pathogen was co-inoculated with Pss22d or either of its mutants, no symptoms of bacterial blight developed on the soybean plants. Despite equal inoculation densities of the pathogen, Psg1a, and Pss22d wild-type or its mutants, respectively, the population size of the pathogen dropped to 10^1 cfu/wound compared to 10^3 cfu/wound in a single inoculation within the first 12 h post inoculation (Fig. 4a-c, solid line). In the presence of the pathogen, Pss22d and its mutants formed stable populations of about 10^4 – 10^5 cfu/wound throughout the time span of the experiments, suggesting that these strains benefited from the co-inoculation with the pathogen. Notably, the population size of mutant Pss22d. Δ sypA/syrE seemed to develop better during co-inoculation than it did after a single inoculation (Fig 4b) and compared to population sizes of the Pss22d wild-type (Fig 4a) and its MeArg-deficient mutant (Fig 4c).

Regardless of the length of inoculation period, in none of the co-inoculation treatments the pathogen population reached 10^7 - 10^8 cfu/wound (Fig. 4a-c, solid line). Pss22d wild-type and its two mutants inhibited the development of the pathogen's population *in planta* and thus the appearance of bacterial blight symptoms.

Role of 3-methylarginine during bacterial *in planta* growth

In order to assess the potential role of MeArg in inhibiting the pathogen Psg1a *in planta*, the population sizes of Psg1a during repeated MeArg treatments were determined. For this test, soybean plants were inoculated with Psg1a suspensions, which reached population densities of 10^6 cfu/wound but did not cause visible symptoms after 3 d of inoculation. At days 3, 6, and 9 post-inoculation, either 20 or 300 ng of purified MeArg was added to the wounds. The population size of the pathogen decreased significantly when 300 ng of purified MeArg were added repeatedly to the infected leaf area but not when 20 ng were added (Fig. 5). The inhibitory effect lasted until day 21, although no additional MeArg was applied after the tenth day. Regardless of the extent to which the pathogen's population size was reduced due to MeArg treatment, from 7 to 10 d after inoculation, the pathogen reached the pathogenic threshold level and caused clear bacterial blight symptoms.

To test for *in situ* production of MeArg, soybean plants were dip-inoculated with Pss22d and Psg1a in single and co-inoculation experiments. 14 d after inoculation, the Pss22d population sizes reached 10^5 cfu/g FW in a single inoculation and 10^7 cfu/g FW in co-inoculation with Psg1a. Subsequently, leaf extracts were purified, and MeArg was isolated and tested in the agar diffusion assay. About 300 ng MeArg/g FW for a single inoculation with Pss22d and 500 ng MeArg/g FW for co-inoculation with Psg1a and Pss22d were detected. Extracts from the non-inoculated control plants did not show any activity in the bioassay with Psg1a. This result suggested that the amount of MeArg produced by Pss22d *in situ* was low compared to the amount of MeArg used for the treatments in this study.

Discussion

Many antimicrobial compounds have been isolated from biocontrol strains and were evaluated for their agricultural use (Vandamme 1994; Raaijmakers *et al.* 2002). However, for most biocontrol organisms that are directly used for crop protection, the mode of action particularly with regard to the contribution of antimicrobial compounds

under *in planta* conditions remained unknown (Handelsman and Stabb 1996; Montesinos 2003).

The soybean epiphyte Pss22d is a promising biocontrol agent since it efficiently inhibited the growth of the plant pathogen Psg *in vitro* and *in planta* under greenhouse and field conditions (May *et al.* 1997; Völksch and May 2001). Pss22d produces the lipodepsipeptides, syringomycin and syringopeptin, and the rare amino acid 3-methylarginine (Braun *et al.* 2008). MeArg but not syringomycin or syringopeptin inhibited the growth of the pathogen Psg *in vitro*, suggesting that lipodepsipeptide antibiotics are not important for the previously reported *in vitro* antagonism (May *et al.* 1997).

Pss22d quickly reached a stable population size of 10^4 cfu/wound on soybean leaves, which is an important prerequisite for biocontrol (Wilson and Lindow 1993; Pujol *et al.* 2007). Neither the epiphytic fitness of the MeArg-deficient mutant, Pss22d.1 nor that of the lipodepsipeptide-negative mutant, Pss22d. Δ sypA/syrE was reduced compared to the fitness of the wild-type. Especially lipodepsipeptides were previously described to act as surfactants, facilitating epiphytic dispersal of the bacteria (Hutchison and Johnstone 1993; Hutchison *et al.* 1995; Hutchison and Gross 1997). Thus dispersed bacteria may benefit from a facilitated acquisition of nutrients from the plant surface. Presumably, mutant Pss22d. Δ sypA/syrE was not affected in its epiphytic fitness because it was applied to artificial wounds, which allowed access to sufficient nutrients. This is in line with experiments with lipodepsipeptide-negative mutants of strain *P. syringae* pv. *syringae* B301D on cherries, which showed no decrease in population size compared to the wild-type (Scholz-Schroeder *et al.* 2001).

Co-inoculating Pss22d and Psg confirmed previous data that showed that the epiphyte efficiently prevents Psg from reaching pathogenic threshold levels (May *et al.* 1997). Co-inoculating the lipodepsipeptide-deficient mutant of Pss22d with Psg did not lead to any significant differences in comparison to the wild-type, suggesting that lipodepsipeptides do not play an important role for the *in planta* antagonism. Although MeArg efficiently inhibited Psg *in vitro* and purified MeArg suppressed the growth of the pathogen *in planta* (Fig. 5), the co-inoculation experiments with the MeArg-negative mutant Pss22d.1 and Psg did not show significant differences compared to the co-inoculation experiment Pss22d/Psg. This contradictory result demonstrates that *in planta* assay conditions strongly differ from *in vitro* assays (Rodriguez and Pfender 1997). Maybe MeArg that was produced *in situ* was absorbed or degraded by plant-borne components as

was gramicidin S, which was shown to tightly bind to leaf surfaces leading to a decrease in activity against pathogens *in planta* (Edwards and Seddon 2001).

In nature, microbes produce toxic compounds usually only under particular conditions and in low doses (Wellington *et al.* 1993), making their *in situ* detection and thus the evaluation of their role problematic (Thomashow *et al.* 1997; Raaijmakers *et al.* 2002). Raaijmakers *et al.* (1999) observed a correlation between *in situ* DAPG production and rhizosphere population development of *P. fluorescens* Q2-87. However, an increased population size did not result in an increase of biocontrol activity against take-all disease of wheat. This observation was explained by the low sensitivity of detection methods (i.e. HPLC) which cannot determine spatial and temporal production patterns in natural environments. DAPG may reach threshold concentrations for activity within certain microsites but remain below this threshold level at other sites where pathogen infection also occurs.

Mechanisms such as nutrient competition or blocking entry sites may play a more important role for the antagonists studied here. Such mechanisms were assumed for the fire blight antagonist, *Pantoea agglomerans* Eh252, and for the antifungal antagonists, *Pseudomonas syringae* ESC-10 and ESC-11 (Bull *et al.* 1998; Stockwell *et al.* 2002). Support for the competition hypothesis in our study is provided by the observation that the pathogen's cell numbers dramatically declined during the first 12 h of co-inoculation with the antagonist. At this stage both organisms live epiphytically on the plant surface, and Pss22d may use up available nutrients, thus temporarily outcompeting the pathogen. This scenario is supported by the observation that Pss22d grows faster than Psg on agar plates. However, once the pathogen enters the plant apoplast, it may access nutrient sources that are not available to the antagonist during epiphytic growth. Under these altered growth conditions, the related microorganisms may switch from antagonistic to symbiotic behavior. It may be that the population of Pss22d grows 10-fold higher in the presence of Psg because Pss22d benefits (indirectly) from nutrients released from the plant cells' cytoplasm that Psg makes available. Starvation caused by Pss22d may keep the pathogen's population below the threshold at which disease symptoms develop. The antagonist Pss22d is likely such an efficient biological control agent against Psg because of multiple active principles that complement each other and can compensate for the loss of a single determinant.

Since neither lipodepsipeptide antibiotics nor MeArg appears to be necessary for the antagonism of Pss22d toward Psg *in planta*, future experiments are needed to identify the antagonistic mechanism(s) of Pss22d against Psg under *in planta* conditions.

Acknowledgments

S. D. B. and B. V. are grateful for financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (VO 558/6-3). D.S. thanks Prof. Boland for his generous support and the Deutsche Forschungsgemeinschaft for an Emmy Noether Fellowship (SP 1106/3-1) as well as for funding by the Verband der Chemischen Industrie and the Max Planck Society.

References

- Adikaram NKB, Joyce DC, Terry LA. (2002) Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit. *Australas Plant Pathol* **31**:223-229.
- Andrews JH. (1992) Biological-control in the phyllosphere. *Annu Rev Phytopathol* **30**:603-635.
- Anjaiah V, Koedam N, Nowak-Thompson B, Loper J, Hofte M, Tambong J, Cornelis P. (1998) Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**:847-854.
- Braun SD, Völksch B, Nüske J, Spiteller D. (2008) 3-Methylarginine from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 suppresses the bacterial blight caused by its close relative *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *ChemBioChem* **9**:1913-1920.
- Bull CT, Wadsworth ML, Sorensen KN, Takemoto JY, Austin RK, Smilanick JL. (1998) Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. *Biol Control* **12**:89-95.
- Carpaneto A, Dalla Serra M, Menestrina G, Fogliano V, Gambale F. (2002) The phytotoxic lipodepsipeptide syringopeptin 25A from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* forms ion channels in sugar beet vacuoles. *J Membr Biol* **188**:237-248.
- Cirvilleri G, Bonaccorsi A, Scuderi G, Scortichini M. (2005) Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. *J Phytopathol* **153**:654-666.

- Clarkson JP, Lucas JA. (1997) The role of antibiotic production by a strain of *Pseudomonas fluorescens* in the suppression of *Pseudocercospora herpotrichoides*, the causal agent of eyespot disease of cereals. *J Appl Microbiol* **82**:499-506.
- Coerper FM. (1919) Bacterial blight of soybean. *J Agric Res* **18**:179-193.
- De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**:6568-6572.
- Dong YH, Zhang XF, Xu JL, Zhang LH. (2004) Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl Environ Microbiol* **70**:954-960.
- Dowling DN, Ogara F. (1994) Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant-disease. *Trends Biotechnol* **12**:133-141.
- Edwards SG, Seddon B. (2001) Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *J Appl Microbiol* **91**:652-659.
- Fogliano V, Ballio A, Gallo M, Woo S, Scala F, Lorito M. (2002) *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**:323-333.
- Grgurina I, Mariotti F, Fogliano V, Gallo M, Scaloni A, Iacobellis NS, Lo Cantore P, Mannina L, Castelli VV, Greco ML, Graniti A. (2002) A new syringopeptin produced by bean strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* **1597**:81-89.
- Haas D, Defago G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* **3**:307-319.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
- Handelsman J, Stabb EV. (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* **8**:1855-1869.
- Heil M, Bostock RM. (2002) Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann Bot (Lond)* **89**:503-512.
- Hutchison ML, Gross DC. (1997) Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol Plant Microbe Interact* **10**:347-354.
- Hutchison ML, Johnstone K. (1993) Evidence for the involvement of the surface-active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease

symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. *Physiol Mol Plant Pathol* **42**:373-384.

Hutchison ML, Tester MA, Gross DC. (1995) Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **8**:610-620.

Janisiewicz WJ, Korsten L. (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol* **40**:411-441.

Johnson KB, Stockwell VO. (1998) Management of fire blight: a case study in microbial ecology. *Annu Rev Phytopathol* **36**:227-248.

King EO, Ward MSK, Raney DE. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**:301-307.

Li S, Jochum CC, Yu F, Zaleta-Rivera K, Du L, Harris SD, Yuen GY. (2008) An antibiotic complex from *Lysobacter enzymogenes* strain C3: Antimicrobial activity and role in plant disease control. *Phytopathology* **98**:695-701.

Lugtenberg BJJ, Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV. (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**:373-383.

May R, Völksch B, Kampmann G. (1997) Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in vitro and in planta. *Microb Ecol* **34**:118-124.

Montesinos E. (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int Microbiol* **6**:245-252.

Murillo J, Shen H, Gerhold D, Sharma A, Cooksey DA, Keen NT. (1994) Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23. *Plasmid* **31**:275-287.

Palmer DA, Bender CL. (1993) Effects of environmental and nutritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Appl Environ Microbiol* **59**:1619-1626.

Paulitz TC, Belanger RR. (2001) Biological control in greenhouse systems. *Annu Rev Phytopathol* **39**:103-133.

Pujol M, Badosa E, Montesinos E. (2007) Epiphytic fitness of a biological control agent of fire blight in apple and pear orchards under Mediterranean weather conditions. *FEMS Microbiol Ecol* **59**:186-193.

- Raaijmakers JM, Bonsall RE, Weller DM. (1999) Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* **89**:470-475.
- Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**:537-547.
- Raaijmakers JM, Weller DM. (2001) Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: Characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Appl Environ Microbiol* **67**:2545-2554.
- Rodriguez F, Pfender WF. (1997) Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta. *Phytopathology* **87**:614-621.
- Scholz-Schroeder BK, Hutchison ML, Grgurina I, Gross DC. (2001) The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of sypA and syrB1 biosynthesis mutant analysis. *Mol Plant Microbe Interact* **14**:336-348.
- Stockwell VO, Johnson KB, Sugar D, Loper JE. (2002) Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology* **92**:1202-1209.
- Stromberg KD, Kinkel LL, Leonard KJ. (2000) Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the causal agent of bacterial leaf streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. *Biol Control* **17**:61-72.
- Thomashow LS. (1996) Biological control of plant root pathogens. *Curr Opin Biotechnol* **7**:343-347.
- Thomashow LS, Bonsall RF, Weller DM. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: Manual of Environmental Microbiology. Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (ed), Washington, DC, ASM Press, 1997, pp 493-499.
- Van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**:453-483.
- Vandamme EJ. (1994) The search for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals. *J Biotechnol* **37**:89-108.
- Vincent MN, Harrison LA, Brackin JM, Kovacevich PA, Mukerji P, Weller DM, Pierson EA. (1991) Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl Environ Microbiol* **57**:2928-2934.

- Völksch B, May R. (2001) Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. *Microb Ecol* **41**:132-139.
- Völksch B, Nüske J, May R. (1996) Characterization of two epiphytic bacteria from soybean leaves with antagonistic activities against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Basic Microbiol* **36**:453-462.
- Wellington E, Marsh P, Toth I, Cresswell N, Huddleston L. (1993) The selective effects of antibiotics in soils. *Trends Microb Ecol* **1**:331-336.
- Williams P. (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* **153**:3923-3938.
- Wilson M, Lindow SE. (1993) Effect of phenotypic plasticity on epiphytic survival and colonization by *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* **59**:410-416.
- Yuen GY, Steadman JR, Lindgren DT, Schaff D, Jochum C. (2001) Bean rust biological control using bacterial agents. *Crop Prot* **20**:395-402.

Table 1. Bacterial strains, plasmids and primers used in this study. (The restriction sequences are underlined within the primer sequences).

Strains	Relevant characteristics	Source
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 22d/93 (Pss22d)	wild-type, isolated from soybean	Völksch <i>et al.</i> 1996
Pss22d.ΔsypA/syrE	<i>sypA</i> <i>syrE</i> mutant of Pss 22d/93, Km ^r , Sp ^r	this study
Pss22d.1	mini-Tn5 derivative of 22d/93, Sp ^r	Braun <i>et al.</i> 2008
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> 1a/96 (Psg1a)	wild-type, isolated from soybean	Völksch <i>et al.</i> 1996
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	(Hanahan 1983)
Plasmids		
pUT/mini-Tn5 Sm/Sp	source of Sp ^r cassette	(de Lorenzo <i>et al.</i> 1990)
pMKm	source of Km ^r cassette	(Murillo <i>et al.</i> 1994)
pGEM.ΔsyrE-Sp	suicide vector for <i>syrE</i> mutagenesis; Sp ^r , Ap ^r	this study
pGEM.ΔsypA-Km	suicide vector for <i>sypA</i> mutagenesis; Km ^r , Ap ^r	this study
Primer		
A - <i>sypA</i>	CAGAGATCGAGGCGTTCA	this study
B - <i>sypA</i> (XbaI)	<u>TCTAGAC</u> ATCGGTTCGGTGATTCG	
C - <i>sypA</i> (XbaI)	<u>TCTAGAG</u> TTTCATCAACACCTTGCC	
D - <i>sypA</i> (SpeI)	<u>ACTAGT</u> GACAATCAGGTAGCGCAG	
E - <i>syrE</i> (SpeI)	<u>ACTAGT</u> AGCACAAGCGAGCATCAGC	
F - <i>syrE</i> (HindIII)	<u>AAGCCT</u> GTAGATGTCCTGCACGTTGG	
G - <i>syrE</i> (HindIII)	<u>AAGCCT</u> CTGCACAACCTGTATGGC	
H - <i>syrE</i>	TGGTCGCTGATCATGTGG	
I - <i>sypA</i> control	TACGCATGGATCTGCATCAG	
J - <i>sypA</i> control	ATCACGACTGTGCTGGTCAT	
L - <i>sypA</i> control	TAATTCCACGCCAGTTGCT	
M - <i>syrE</i> control	CTGATGCTGGACAACGGTTA	
N - <i>syrE</i> control	GCGTGCATAATAAGCCCTAC	
O - <i>syrE</i> control	ATTGGCGGCCTTGCTGTTCTTCTA	
P - <i>syrE</i> control	AGGCGACATGGAACAGCACC	

Figure legends

Fig. 1 Top, size of the syringopeptin/syringomycin biosynthetic cluster of *P. syringae* pv. *syringae* 22d/93. Center, enlargement of the syringopeptin/syringomycin biosynthetic cluster, showing the locations and orientations of the first syringopeptin (*syrP*, *syrD*, *sypA*, and *sypB*) and syringomycin (*syrB1*, *syrB2*, *syrC*, and *syrE*) biosynthetic genes. Bottom, enlargement of the mutagenized region, showing the locations of the inserted resistance cassettes in the *sypA* and *syrE* gene, respectively, and of all primers used in this study.

Fig. 2 Agar diffusion bioassays with the indicator strains *P. syringae* pv. *glycinea* 1a/96 sensitive to 3-methylarginine (a), *G. candidum* sensitive to syringomycin (b), and *B. megaterium* sensitive to syringopeptin (c). 1, Pss22d; 2, syringomycin/syringopeptin-negative mutant Pss22d.ΔsypA/syrE; 3, Psg1a; 4, 3-methylarginine-negative mutant Pss22d.1.

Fig. 3 Growth kinetics (solid line) and 3-methylarginine production (dotted line) of Pss22d wild-type, syringomycin/syringopeptin-negative mutant Pss22d.ΔsypA/syrE, and 3-methylarginine-negative mutant Pss22d.1 in HSC liquid medium at 28 °C (n = 3, error bars indicate standard deviations).

Fig. 4 Population dynamics of Psg1a, Pss22d, and Pss22d-mutants after single (dotted line) and co-inoculation (solid line). Single inoculations of all strains were used both to evaluate the epiphytic fitness of Pss22d wild-type and Pss22d-mutants, and as controls to compare with the co-inoculation experiment. (a) co-inoculation Psg1a-Pss22d and controls, (b) co-inoculation Psg1a-Pss22d.ΔsypA/syrE and controls, (c) co-inoculation Psg1a-Pss22d.1 and controls. (Note: in single- and co-inoculation treatments the start cell densities of Pss22d and Pss22d-mutants were 4×10^3 cfu/wound and for Psg1a 2×10^3 cfu/wound)

Fig. 5 Population dynamics of Psg1a after application of different amounts of 3-methylarginine (MeArg). Arrows indicate the time point of applications on days 3, 6, and 9 onto the infected wounds. Within the sampling days, the values marked with the same letter did not differ significantly (one-way ANOVA, $p < 0.05$; n=3, error bars indicate standard deviation).

Figure 1

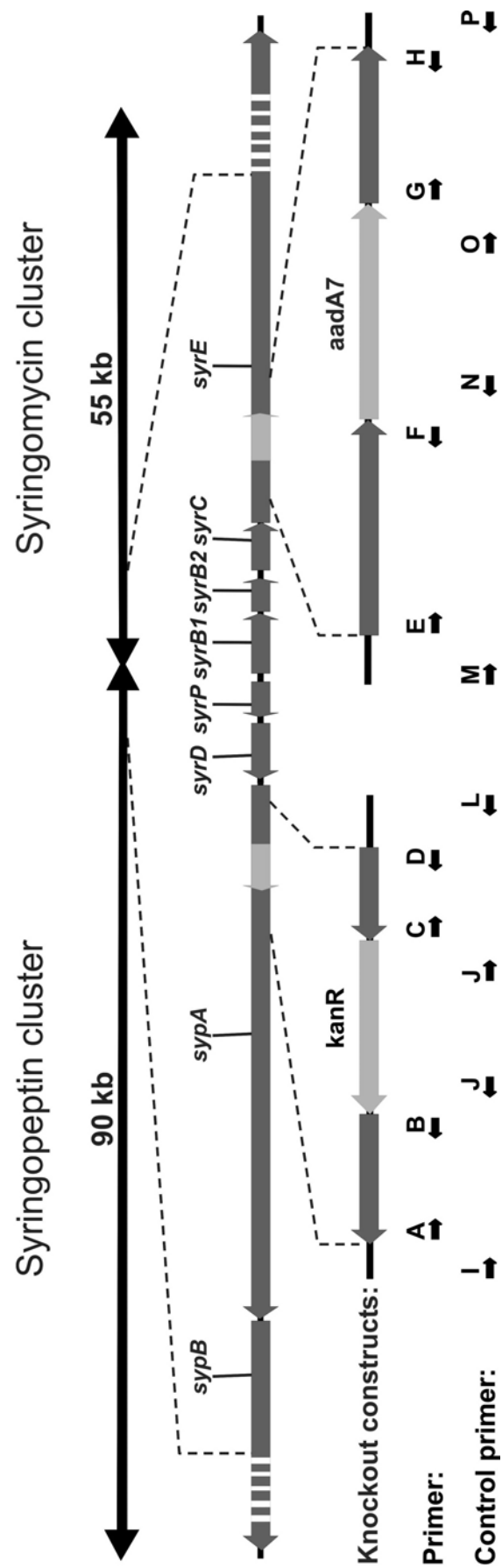


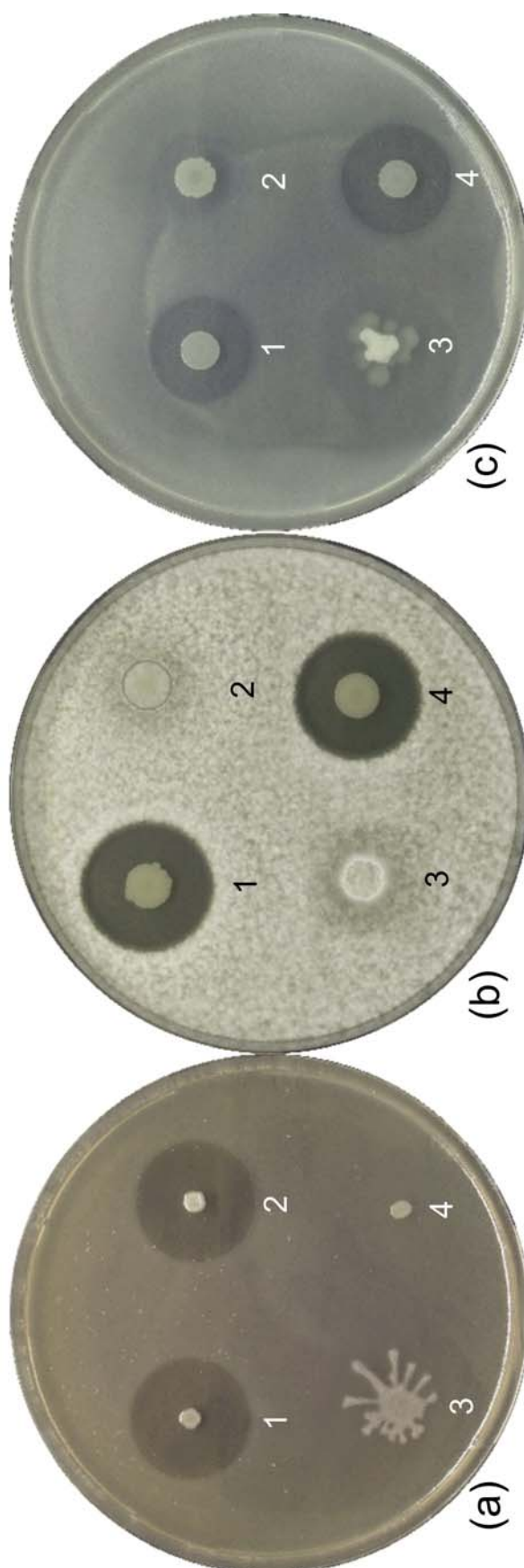
Figure 2

Figure 3

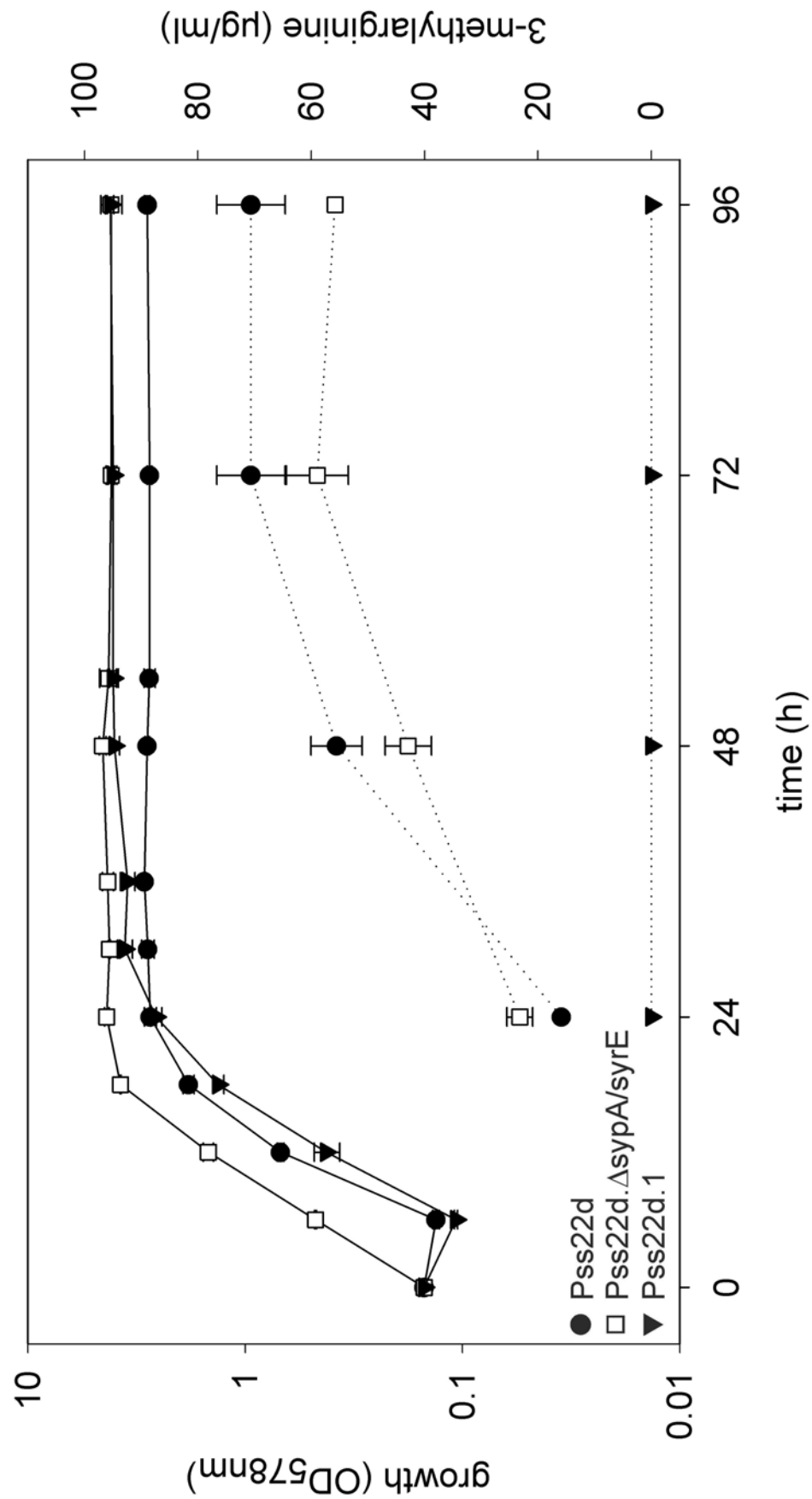


Figure 4

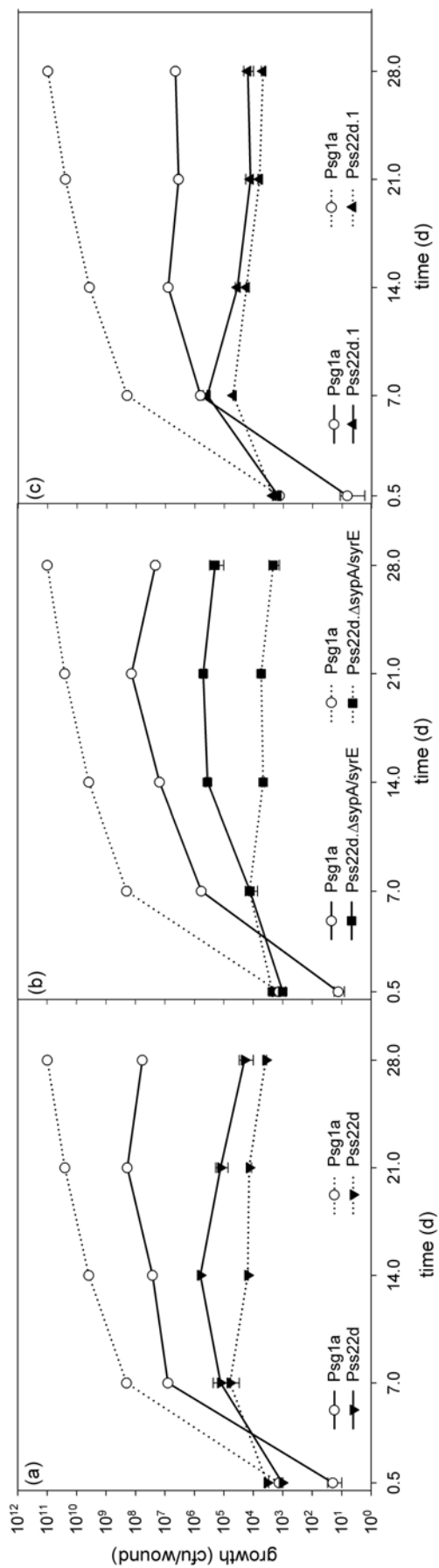
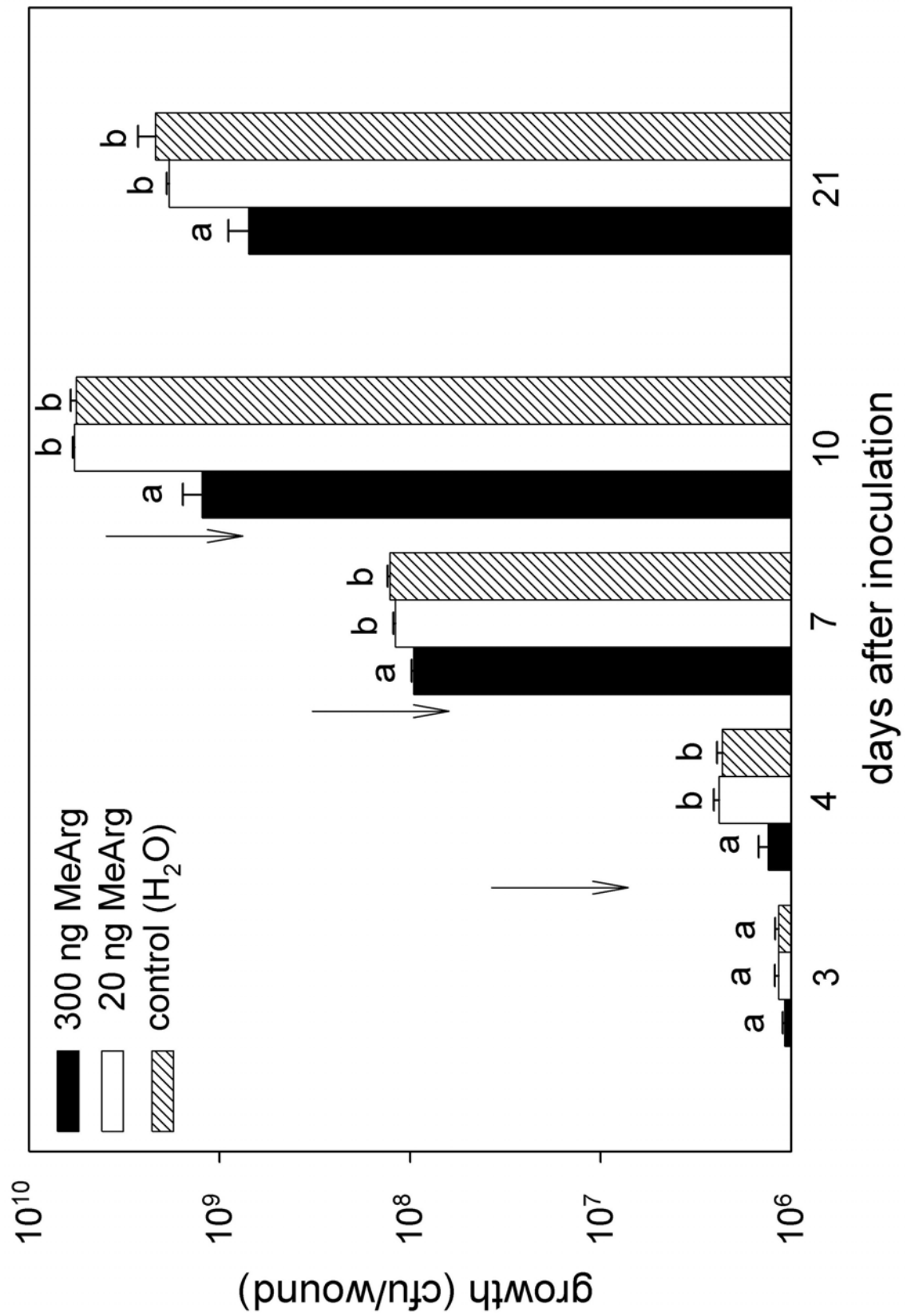


Figure 5



4. Gesamtdiskussion

Die in den letzten Jahren immer wiederkehrende Diskussion über mit Pflanzenschutzmitteln belastete Nahrung führte bei einer Vielzahl von Menschen zu einem stärkeren Bewusstsein, Produkte aus biologischem und nachhaltigem Anbau zu erwerben. Unter solchen Bedingungen ist die verstärkte Untersuchung und Vermarktung biologischer Pflanzenschutzmittel auf der Basis von mikrobiellen Lebewesen, wie sie in den USA schon seit längerem verfügbar sind (Stockwell & Stack, 2007), auch in der Europäischen Union zu empfehlen. Doch gerade die stark schwankende Effizienz mikrobieller Biokontrollorganismen (BKO) erschwert ihre Vermarktung. Die Studien zur Biologischen Kontrolle sollten daher darauf gerichtet sein, die Fragen zu klären, wie die Effizienz stabilisiert oder sogar erhöht werden kann. Insbesondere in Bezug auf die Phyllosphäre fehlt bislang grundlegendes Wissen über die Lebens- und Wirkungsweise mikrobieller BKO.

Ein sehr gutes, dreigliedriges Modellsystem (Pathogen-Antagonist-Pflanze), an dem Fragen zur Effektivität eines BKO oder zu Wirkmechanismen geklärt werden können, ist die Biologische Kontrolle des Bakterienbranderreger an der Sojabohne, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg), durch den Antagonisten *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d). Die Vorteile dieses Systems sind die sehr hohe Wirksamkeit des Stammes Pss22d gegenüber dem Erreger Psg (May *et al.*, 1997; Völksch & May, 2001) sowie die vorhandenen Kenntnisse über alle beteiligten Modellorganismen (Bender *et al.*, 1999; Smirnova & Ullrich, 2004; Weingart *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2005). Somit können gezielte Untersuchungen über die Wirkmechanismen des Antagonismus zwischen Pss22d und Psg auf der Sojabohne durchgeführt werden. Im Speziellen sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob die von Pss22d produzierten Toxine einen Einfluss auf das Pathogen Psg *in vitro* und *in planta* haben. Die Antibiose spielt bei einigen BKO eine bedeutende Rolle, wie zum Beispiel für *Pseudomonas fluorescens*, der den antibiotischen Wirkstoff 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) produziert (Keel *et al.*, 1992; Cronin *et al.*, 1997b). An dem in dieser Arbeit untersuchten System wurde schon von Völksch und Mitarbeitern (1996) eine starke *in vitro* Hemmung des Pathogens durch Pss22d nachgewiesen. Diese Hemmung kann nur unter Zugabe von L-Arginin aufgehoben werden und beruht auf dem damals noch nicht identifizierten Toxin 3-Methylarginin. Die starke *in vitro* Hemmung und das Wissen um die sehr gute *in planta* Effizienz von Pss22d warf die Frage auf, ob die von Pss22d produzierten Toxine im *in planta* Antagonismus eine bedeutende Rolle spielen. Um diese Frage zu klären, wurden Toxin-negative Mutanten erzeugt und deren antagonistisches Potential untersucht. Darüber hinaus wurde das für

Pseudomonaden noch nicht beschriebene Toxin 3-Methylarginin charakterisiert und die Biosynthese aufgeklärt.

4.1. 3-Methylarginin, eine toxische Aminosäure

Pss22d produziert neben den bekannten Toxinen Syringomycin und Syringopeptin (Völksch & Weingart, 1998; Bender *et al.*, 1999; Scholz-Schroeder *et al.*, 2001a) ein drittes Toxin, das im Rahmen dieser Arbeit als 3-Methyl-L-arginin (MeArg) identifiziert wurde (Manuskript I). Die Struktur von MeArg ähnelt derjenigen der essentiellen Aminosäure L-Arginin. Im Gegensatz zu Arginin ist das dritte C-Atom methyliert und bedingt dadurch offenbar die toxische Wirkung von MeArg (Abb. 5). *In vitro* Untersuchungen mit verschiedenen potentiellen Pflanzenpathogen ergaben, dass das von Pss22d produzierte MeArg spezifisch auf das Pathogen Psg wirkt. Die Wirkungsweise und die ökologische Bedeutung von MeArg sind im Moment nur spekulativ und sollen an dieser Stelle diskutiert werden.

Da die *in vitro* Hemmung des Pathogens Psg nur durch L-Arginin aufgehoben werden kann, sind verschiedene Wirkmechanismen denkbar. Der Einbau von MeArg an Stelle des L-Arginins in Enzyme des Primärstoffwechsels könnte ihre Funktion einschränken und letztendlich zum Absterben der Zelle führen. Jedoch ist die Menge an MeArg, die von Pss22d *in vitro* produziert wird (ca. 2 mg/l), zu gering, um in metabolische Konkurrenz zu L-Arginin zu treten. Aufgrund solch geringer Mengen an MeArg ist eher eine Funktion als Enzyminhibitor nahe liegend. Als mögliches Zielenzym könnte Argininosuccinase aus der Arginin-Biosynthese in Frage kommen, da auch Argininosuccinat als direkte Vorstufe zum L-Arginin die *in vitro* Hemmung nicht aufheben konnte. Da dieses Enzym leider nicht kommerziell erhältlich ist, konnten Enzymassays zur Bestätigung noch nicht durchgeführt werden. Es ist jedoch eine Vielzahl von Toxinen

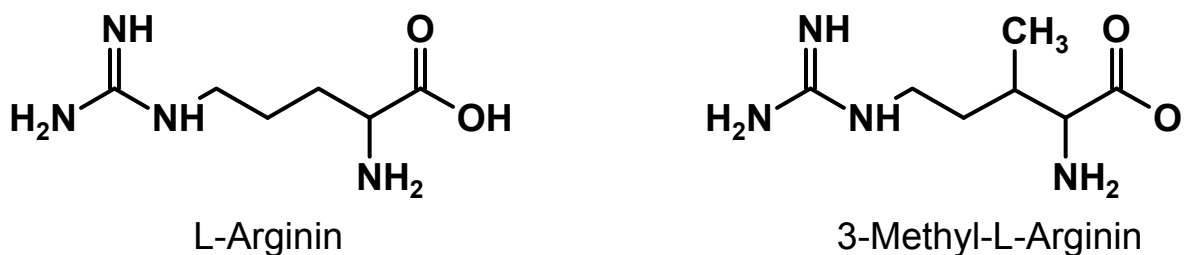


Abb. 5: Struktur von L-Arginin und 3-Methylarginin.

Das durch die Methylgruppe modifizierte 3-Methylarginin wirkt hochspezifisch auf das Pathogen des Bakterienbrandes der Sojabohne *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.

bekannt, die in den Biosyntheseweg von L-Arginin eingreifen (Bender *et al.*, 1999; Hernandez-Guzman & Alvarez-Morales, 2001; Arrebola *et al.*, 2003). Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist Phaseolotoxin, das von *P. syringae* pv. *phaseolicola* produziert wird (Mitchell & Bielecki, 1977; Bachmann & Patil, 2003; Genka *et al.*, 2006). Phaseolotoxin hemmt die Ornithin-Carbamoyltransferase (OCT), wodurch es zur Anreicherung von Ornithin und zu einem Mangel an L-Arginin kommt. Letztendlich führt das Defizit von L-Arginin zum Erliegen des Primärstoffwechsels und zum Absterben der Zelle. Ein weiteres Beispiel ist das bei *P. syringae* pv. *syringae* neu entdeckte Mangotoxin (Arrebola *et al.*, 2003; Arrebola *et al.*, 2007), welches die Ornithin-N-Acetyltransferase blockiert und ähnlich zu Phaseolotoxin die Arginin-Biosynthese unterbindet. Darüber hinaus ist bekannt, dass Arginin-homologe Substanzen die im Tier-, Pflanzen- und Mikobenreich weit verbreitete Stickstoffmonoxid-Synthase (nitric-oxide-synthase, NOS) hemmen (Fishlock *et al.*, 2003; Kers *et al.*, 2004; Ijuin *et al.*, 2005). Die NOS setzt L-Arginin zu dem Botenstoff Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) um, der eine bedeutende Rolle in vielen Signalwegen spielt (Moncada & Palmer, 1991). Bei bakteriellen Pflanzenpathogenen gibt es Hinweise, dass NO in Signalwegen der Virulenz eine bedeutende Rolle spielt. Ein Beispiel ist der gut untersuchte Transkriptionsfaktor OxyR, der über NO aktiviert wird und in seiner aktiven Form Gene verschiedener Oxy-Proteine regelt. Solche antioxidativen Proteine schützen das Pathogen vor dem von der Pflanze ausgelösten, oxidativen Stress (Mur *et al.*, 2006). Bezogen auf die Wirkung von MeArg könnte die Hemmung der NOS durch MeArg bei Psg dazu führen, dass pflanzliche Abwehrmechanismen (z. B. oxidativer Stress) nicht mehr ausreichend kompensiert werden, und die Populationsdichte des Erregers den kritischen Schwellenwert zum Ausbilden von Krankheitssymptomen nicht überschreitet. Da Gene, die für NOS kodieren, auch im vollständig sequenzierten Genom des Stammes *P. syringae* pv. *syringae* B728a (PssB728a) identifiziert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass NOS auch bei weiteren Pathovaren innerhalb der Art *P. syringae* verbreitet ist (Feil *et al.*, 2005).

4.2. 3-Methylarginin-Biosynthesegencluster und regulatorische Funktionen

Um die Biosynthesegene der MeArg-Produktion zu identifizieren, wurde eine durch das Transposon Tn5 vermittelte Mutagenese durchgeführt. Das hier verwendete Plasmid pUT/mini-Tn5 Sm/Sp ist so konstruiert, dass die Transposase außerhalb des Transposons kodiert und somit nicht in das Genom integriert (Wilson *et al.*, 1995). Mit dieser Methode konnten einzelne Gene deletiert und verschiedene Geno- und Phänotypen des Stammes Pss22d erzeugt werden. Um eine Vielzahl von Tn5-Mutanten auf einen gesuchten

Phänotyp zu prüfen, muss ein sensitives und gut handhabbares Screening-System etabliert werden. Das in dieser Arbeit verwendete Selektionssystem beruht auf dem schon von Völksch und Mitarbeitern (1996) angewendeten Agardiffusionstest mit Psg als Indikatororganismus. Der Bioassay wurde für das Screening der Tn5-Mutanten standardisiert (Manuskript I) und ermöglichte innerhalb kurzer Zeit, Mutanten mit veränderter MeArg-Produktion zu selektieren (Manuskript II). Von ca. 2.500 erzeugten Pss22d-Mutanten waren 21 in ihrer MeArg-Produktion beeinflusst. Von diesen Mutanten waren vier MeArg-negativ, und zwei produzierten eine signifikant höhere Menge MeArg als der Wildtyp Pss22d. Erstaunlicherweise produzierte nur die MeArg-negative Mutante Pss22d.1 noch wie der Wildtyp Pss22d die Toxine Syringomycin und Syringopeptin. Somit war Pss22d.1 sehr gut zur Untersuchung von möglichen Biosynthesegenen der MeArg-Produktion geeignet (Manuskript II).

Die Analyse der durch das Transposon deletierten Gene erfolgte über Selektion der Transposon-Integrationsstelle und anschließender Sequenzierung. Hierfür wurde die genomische DNA der Mutanten isoliert, mit dem Restriktionsenzym *SalI* verdaut und mit dem *SalI* geschnittenen Plasmid pBBR1MSC ligiert. Die erhaltenen Plasmide wurden in *E.coli* DH5 α transformiert und das im Transposon befindliche Spectinomycin-Resistenzgen selektiert. Um die flankierenden Regionen des Tn5-Transposons zu analysieren, wurde ein direkt aus der Sequenz des Transposons abgeleiteter Primer verwendet. Diese Methode ermöglichte es, kleine DNA-Bereiche um die Integrationsstelle des Transposons zu identifizieren, da die Größe der DNA-Fragmente stark durch die Aufnahmekapazität des verwendeten Klonierungsvektors pBBR1MSC eingeschränkt war. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Sequenzierungen wurden weitere Bereiche mittels Adaptor-PCR (Rogers *et al.*, 2005) und *in silico* Analysen ermittelt, um Sequenzinformation über benachbarte Gene zu erhalten.

Die aus den Sequenzierungen gewonnenen Informationen wurden direkt mit dem sehr nah verwandten und vollständig sequenzierten Stamm PssB728a verglichen (Feil *et al.*, 2005). Im Genom der MeArg-negativen Tn5-Mutante Pss22d.1 konnte ein Gen identifiziert werden, das für eine *S*-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methyltransferase kodiert (Manuskript I, II). Durch *in silico* Analyse der Nachbarregionen zur Methyltransferase im Genom von PssB728a wurden zwei weitere Gene identifiziert. Ein Gen, das für eine Aminotransferase kodiert, überschneidet sich in vier Basen mit dem Gen der Methyltransferase. Diese Anordnung legt die Vermutung nahe, dass diese Gene ein gemeinsames Operon bilden. Weiterhin wurde ein Gen, kodierend für einen Exporter,

gefunden, der zur Familie der LysE-Exporter gehört und die Exkretion verschiedener Aminosäuren vermittelt (Aleshin *et al.*, 1999). Somit könnten die im PssB728a gefundenen Gene die Biosynthese von MeArg im Stamm Pss22d vermitteln.

Ausgehend von den Sequenzinformationen des Stammes PssB728a wurden Primer für die Amplifizierung des vermutlichen Biosynthesegenclusters für MeArg abgeleitet. Da die Sequenzen aus PssB728a nur zum Teil mit denen aus dem hier untersuchten Stamm Pss22d übereinstimmen, konnte vorerst nur ein 2.795 bp großes Fragment des Clusters amplifiziert werden. Dieses Fragment wurde in pJET1.2 (Fermentas) kloniert (pJ2795) und vollständig sequenziert. Ausgehend von den gewonnenen Sequenzinformationen konnten mittels Adaptor-PCR (Rogers *et al.*, 2005) die angrenzenden Sequenzen ermittelt werden. Aus diesen wurden anschließend Primer abgeleitet, die für die Amplifikation des Gesamtclusters dienten (Manuskript II). Das amplifizierte, 3.150 bp große Fragment wurde sowohl in den Vektor pBBR1MSC (pB3150) als auch in die Vektoren pGEM T-Easy (pG3150) und pJET1.2 (pJ3150) kloniert. Das Plasmid pJ3150 wurde anschließend genutzt, um das Fragment vollständig zu sequenzieren. *In silico* Analysen der aus dem Genom von Pss22d gewonnenen Sequenz bestätigten, dass sich das vermutliche MeArg-Biosynthesegencluster aus drei offenen Leserahmen (ORF) zusammensetzt. ORF 1 ist zu 96 % homolog zu einer Methyltransferase, die vom Gen *psyr_0118* (CP000075) aus PssB728a kodiert wird. Diese Methyltransferase des Typs 12 besitzt zudem eine SAM-Bindestelle. Die für ORF 2 kodierende Sequenz weist eine Homologie von 93 % zum Gen *psyr_0117* (CP000075) auf, welches für eine Aminotransferase kodiert. Das Gen für ORF 3 ist zu 94 % identisch mit *psyr_0116* (CP000075) und kodiert für einen RhtB-Exporter der LysE Superfamilie (Manuskript II). Da die Gene für den Stamm Pss22d erstmals beschrieben wurden, wurden im Manuskript II folgende Namen vorgeschlagen: ORF 1 (Methyltransferase) – *mrsA* (Methylarginin Synthese), ORF 2 (Aminotransferase) – *mrsB* und ORF 3 (MeArg-Exporter) – *mrsC*. Die Gene *mrsA/B* zeichnen sich, wie auch im Genom vom PssB728a, durch eine Überlappung von vier Basenpaaren aus. Dieses Phänomen ist aus der Literatur bekannt und wird als „overlapping genes“ beschrieben (Normark *et al.*, 1983; Gesteland & Atkins, 1996). Dabei kann durch translationale Kopplung die Expression beider Proteine im stöchiometrischem Verhältnis sichergestellt werden (Liljestrom *et al.*, 1988; Blinkova *et al.*, 1997). Die Genprodukte sind daher häufig funktionell gekoppelt (Oppenheim & Yanofsky, 1980; Yakhnin *et al.*, 2001).

Durch Komplementierung der Mutante Pss22d.1 mit dem Vektor pB3150 (*mrsA/B/C*) konnte der Phänotyp des Wildtyps Pss22d wieder hergestellt werden. Darüber

hinaus konnte auch *E. coli* DH5 α durch Transformation des Vektors pG3150 (*mrsA/B/C*) angeregt werden, MeArg *in vitro* zu produzieren. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Gene *mrsA/B/C* für die MeArg-Biosynthese in Gram-negativen Bakterien notwendig und hinreichend sind. Um die Funktion des gefundenen RhtB-Exporters (*mrsC*) zu untersuchen, wurden Komplementierungsversuche in *E. coli* DH5 α durchgeführt. Hierfür wurde das Plasmid pG2795, welches die Gene *mrsA/B* trägt, in *E. coli* transformiert und die Transformanten auf MeArg-Produktion geprüft. Das Fehlen des Gens *mrsC* führte im Agardiffusionstest zum Ausbleiben einer nachweisbaren Wirkung des Toxins MeArg. Dieses Ergebnis bestätigt, dass der RhtB-Exporter aktiv an der Exkretion von MeArg beteiligt ist. Aufgrund der auf Proteinebene hohen Homologien aller an der MeArg-Biosynthese beteiligten Gene (*mrsA/B/C*) zu dem nah verwandten Stamm PssB728a lag die Vermutung nahe, dass auch PssB728a das Toxin MeArg bildet. Doch weder im Agardiffusionstest, noch in der ESI-MS konnten Spuren von MeArg im Überstand von PssB728a gefunden werden. Möglicherweise sind die geringen Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Methyltransferase von PssB728a entscheidend, dass entweder keine oder eine andere Verbindung methyliert wird.

Die genetische Analyse der Mutanten mit der zum Wildtyp Pss22d unterschiedlicher MeArg- und Lipodepsipeptid-Produktion zeigte, dass verschiedenste regulatorische Systeme die Produktion von MeArg beeinflussen (Manuskript II). In der Tn5-Mutante Pss22d.3 wurde das Gen *gacA* deletiert, welches ein Bestandteil des globalen Regulatorsystems GacS/GacA ist. Durch diese Mutation war Pss22d.3 nicht mehr in der Lage, die Toxine MeArg und Syringomycin zu produzieren. Wie schon bei anderen Pseudomonaden gezeigt, spielt GacS/GacA eine bedeutende Rolle bei der Regulation verschiedener Sekundärmetabolite (Heeb & Haas, 2001). Im Zusammenhang mit der Biosynthese von Syringomycin wurde das Regulatorgen *sala* beschrieben, welches durch das GacS/GacA System positiv reguliert wird (Kitten *et al.*, 1998). Da die Expression des Genes *sala* durch sich selbst negativ reguliert wird, führte eine Mutation im GacS/GacA System zum Ausfall des Regulatorproteins *sala*. Andere Studien zeigten, dass durch gezielte Deletion von *sala* die Produktion von Syringomycin im Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301d stark beeinflusst wurde (Lu *et al.*, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Da die Mutante Pss22d.3 kein Syringomycin produzierte, liegt die Vermutung nahe, dass die Toxine Syringomycin und MeArg über GacS/GacA und *sala* koordiniert reguliert werden. Eine andere MeArg-negative Mutante (Pss22d.2) wies eine Störung im Regulatorsystem PhoP/PhoQ auf. Auch bei dieser Mutante scheint die

Regulation von Syringomycin und MeArg koordiniert zu sein, da beide Toxine nicht synthetisiert wurden. Bei *Salmonella spec.* ist dieses Regulatorsystem in die Regulation von mehr als 40 Proteinen involviert (Miller & Mekalanos, 1990). Es reagiert sowohl im Medium als auch in der natürlichen Umgebung negativ auf erhöhte Magnesiumkonzentrationen (Soncini *et al.*, 1996). Wiederholt wurde PhoP/PhoQ auch im Zusammenhang mit der Virulenz einiger Gram-negativer Bakterien beschrieben (Llama-Palacios *et al.*, 2003; Fontan *et al.*, 2004). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass Syringomycin ebenfalls durch das PhoP/PhoQ-System reguliert wird. Da Syringomycin ein bekannter Virulenzfaktor von *P. syringae* pv. *syringae* ist (Bender *et al.*, 1999), ist es wahrscheinlich, dass PhoP/PhoQ auch in Pss22d verschiedene Virulenzfaktoren reguliert. Den gleichen Phänotyp wie die Mutanten Pss22d.3 und Pss22d.2 zeigte auch Pss22d.6. In dieser Mutante war ein Gen mit hoher Homologie zu *arsR* deletiert. ArsR ist bekannt als Repressorprotein verschiedener Gene und wird im Zusammenhang mit Schwermetallresistenz bei Prokaryoten diskutiert (Busenlehner *et al.*, 2003; Eicken *et al.*, 2003). Die Rollen von PhoP/PhoQ und ArsR bei der Regulation müssen in weiteren Studien geklärt werden. Da es sich aber bei beiden Systemen um Regulatoren handelt, die stark auf exogene Umwelteinflüsse reagieren, ist zu vermuten, dass MeArg abhängig von der natürlichen Umgebung *in situ* gebildet wird.

Die Phänotypen der Mutanten Pss22d.7 und Pss22d.8 unterschieden sich grundlegend von denen der vorher beschriebenen Mutanten. Beide Mutanten produzieren die Toxine Syringomycin und MeArg über, wohingegen die Synthese von Syringopeptin nicht nachzuweisen war. Das in Pss22d.7 deletierte Gen zeigte große Homologien zu Genen der Familie der ATP-abhängigen Proteasen, wie z. B. Lon, FtsH, ClpAP und HslUV (Gottesman, 2003). Diese Enzyme greifen durch Proteolyse verschiedener Regulatorproteine direkt in regulatorische Systeme ein (Jenal & Hengge-Aronis, 2003). Pss22d.8 zeigte eine Deletion in einem Gen homolog zu ORF 3 aus der Biosynthese von Mangotoxin (Arrebola *et al.*, 2007). Die Rolle dieses ORFs bei der Mangotoxin-Produktion ist nicht bekannt, es scheint sich aber um ein regulatorisches Gen zu handeln, dessen Transkriptionsprodukt vor allem die Produktion von Sekundärmetaboliten beeinflusst. In weiterführenden Arbeiten könnte durch Analyse der Regulation der Synthese von MeArg und beteiligter Signalwege auch die ökologische Bedeutung von MeArg besser verstanden werden.

4.3. Analyse der 3-Methylarginin-Biosynthese

Durch Markierungsexperimente mit Deuterium-markiertem Methionin konnte bewiesen werden, dass die Methylierung des MeArg über die von *mrsA* kodierte SAM-abhängige Methyltransferase vermittelt wird (Manuskript I). Diese Art der Methylierung wurde bereits für 3-Methylglutamat beschrieben, wobei die homologen SAM-abhängigen Methyltransferasen GlmT, DptI und LptI α -Ketoglutarat zu 3-Methylglutamat methylieren (Mahlert *et al.*, 2007). 3-Methylglutamat ist ein wichtiger Bestandteil der Antibiotika CDA (calcium-dependent antibiotic) und Daptomycin. Sowohl die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Methyltransferase als auch die von Mahlert und Mitarbeitern (2007) beschriebene Methyltransferase arbeiten nach dem Prinzip der nicht-radikalischen Methylierung. Eine Methylierung durch ein radikales SAM konnte mittels fehlender Bindungsstellen für Cobalamin und Fe-S ausgeschlossen werden (Sofia *et al.*, 2001). Detaillierte Vergleiche der Motive zeigten, dass die Methyltransferase der Biosynthese von MeArg zur Familie des Typs 12 der SAM-abhängige Methyltransferasen gehört, wohingegen bei der Synthese des 3-Methylglutamats eine zur UbiE Familie zugehörige SAM-abhängige Methyltransferase die Methylierung katalysiert (Mahlert *et al.*, 2007). Aufgrund der nachgewiesenen Struktur von MeArg und dem Wissen um den Mechanismus

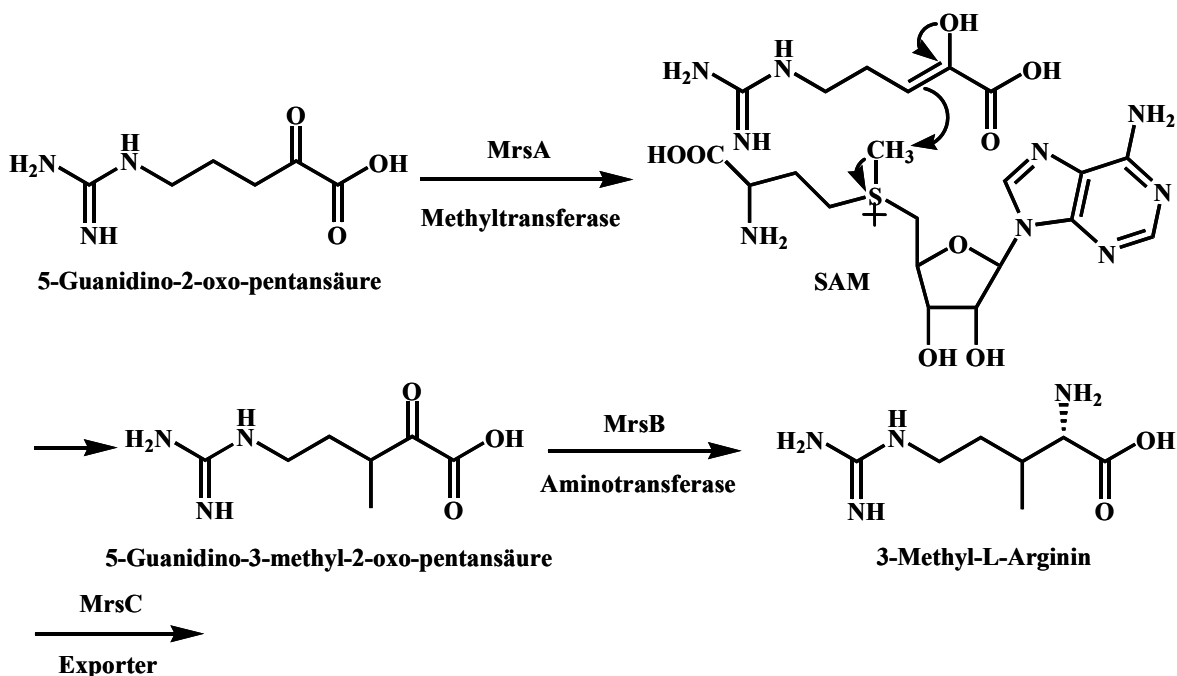


Abb. 6: Biosynthese von 3-Methylarginin

Postulierter Biosyntheseweg des von *P. syringae* pv. *syringae* 22d/93 produzierten Toxin 3-Methyl-L-arginin. Ausgehend vom Edukt 5-Guanidino-2-oxo-pentansäure entsteht durch Methylierung des dritten Kohlenstoffs und anschließender Transaminierung der Oxosäure das gegenüber *P. syringae* pv. *glycinea* selektive Toxin 3-Methyl-L-arginin.

der SAM-abhängigen Methylierung, konnte ein Biosyntheseweg postuliert werden (Manuskript I, II). Hierbei wird das Substrat 5-Guanidino-2-oxo-pentansäure durch die SAM-abhängige Methyltransferase MrsA methyliert und die entstandene 5-Guanidino-3-methyl-2-oxo-pentansäure durch die Aminotransferase MrsB zu MeArg umgesetzt (Abb. 6).

4.4. Heterologe Expression und Charakterisierung von *mrsA* und *mrsB*

Zur Charakterisierung der Enzyme MrsA (Methyltransferase) und MrsB (Aminotransferase) wurden diese heterolog in *E. coli* überexprimiert. Durch Verwendung eines His-Tags konnten die Proteine durch Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Smith *et al.*, 1988) (Manuskript II). Die heterologe Expression beider Enzyme im Expressionsstamm *E. coli* BL21 war erfolgreich, jedoch konnte nur die Methyltransferase MrsA in löslicher Form isoliert werden. Die Aggregation von unlöslichen Proteinen in Einschlusskörpern, wie für MrsB beobachtet, stellt ein häufig auftretendes Problem bei der heterologen Proteinexpression dar. Mögliche Ursachen hierfür sind, dass die Zellen nach der Expression zu notwendigen post-translationalen Modifikationen der Fremdproteine nicht fähig sind oder dass die Proteine toxisch auf die Zelle wirken (Thomas *et al.*, 1997). Auch nach Variation der Kultivierungsbedingungen, wie z. B. Temperatur und IPTG-Konzentration, sowie der Koexpression von Chaperonen, die die Proteinfaltung unterstützen, konnte MrsB nicht erfolgreich isoliert werden. Der verwendete His-Tag sowie dessen Lage könnten ebenfalls ein Problem für die Proteinfaltung darstellen (Loughran *et al.*, 2006). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die translationale Kopplung beider Gene die Expression im heterologen System erschwert und die erfolgreiche Expression und Reinigung nur im Operon durch Kotranslation möglich ist. Dafür spricht die bereits erwähnte Überlappung der Gene *mrsA/B* im 4-Basenpaar-langen Überlappungsbereich *mrsA*-ATGA-*mrsB*. Bekannt ist dies für das Tryptophan-Operon (*trpED*), bei dem die translationale gekoppelten Polypeptide einen funktionalen Enzymkomplex bilden (Oppenheim & Yanofsky, 1980). Eine Enzym-Komplexbildung von MrsA und MrsB könnte demnach MrsB stabilisieren. Ein Einfluss von MrsB auf die Funktion von MrsA konnte hingegen nicht gezeigt werden.

Über heterologe Expression von MrsA in *E. coli* BL21 konnten ca. 7 mg/ml Enzym gewonnen werden. Um die Spezifität der Methyltransferase MrsA zu untersuchen, wurden Enzymassays mit dem postulierten Substrat 5-Guanidino-2-oxo-pentansäure sowie drei weiteren Ketosäuren (Pyruvat, α -Ketoglutarat, Phenylpyruvat) durchgeführt. Da nur 5-

Guanidino-2-oxo-pentansäure von MrsA umgesetzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass MrsA eine hohe Substratspezifität aufweist. Ähnlich hohe Substratspezifitäten wurden für die *N*-Methyltransferase und die vom 3-Methylglutamat bekannte Methyltransferase (GlmT) beobachtet (Chen & Wood, 2004; Milne *et al.*, 2006; Mahlert *et al.*, 2007). Die massenspektrometrische Analyse der Enzymassays zeigte neben dem Substrat 5-Guanidino-2-oxo-pentansäure einen neuen Peak bei 22,0 min im Totalionenstrom-Chromatogramm (Manuskript II). Das Massenspektrum dieses Produktes wies eine Verschiebung von 14 Masseneinheiten im Vergleich zum Substrat 5-Guanidino-2-oxo-pentansäure auf, was dem Einbau einer Methylgruppe in das Substrat zur 5-Guanidino-3-methyl-2-oxo-pentansäure entspricht. Die Struktur des Produkts wurde nach der Aufreinigung durch NMR-Spektroskopie bestätigt. Das durch die Methylierung von MrsA entstandene Produkt 5-Guanidino-3-methyl-2-oxo-pentansäure dient als Substrat von MrsB, welches die Transaminierung der Oxofunktion in Position 2 katalysiert, wodurch MeArg gebildet wird. MrsA zeigte bei Inkubationen in unterschiedlichen pH-Bereichen ein Optimum bei pH 9,0. Das Temperaturoptimum lag bei 45 °C (pH 8). Für verschiedene andere, SAM-abhängige Methyltransferasen (COMT I, COMT II, IEMT, NNMT und BseCI MTase) wurde ein pH-Optimum zwischen 6,5 und 8,0 und ein Temperaturoptimum zwischen 35 °C und 55 °C beschrieben (Rina & Bouriotis, 1993; Wang & Pichersky, 1998; Inoue *et al.*, 2000; Chen & Wood, 2004). Ähnliche Eigenschaften wurden für MrsA aus Pss22d beobachtet. MrsA weist ein typisches Temperaturprofil auf, wonach die Aktivität stetig bis 45 °C ansteigt und aufgrund von Denaturierung des Proteins rasch abfällt. Eine Erhöhung der Temperatur um 10 °C führte zu einer Verdopplung der Umsatzrate. Die Umsatzkurve von MrsA zeigt eine für Enzyme typische Sättigungskurve (Berg *et al.*, 2003). Ein Substratumsatz von 50 % in 45 min entspricht einer sehr guten Enzymaktivität bei der Produktion von Sekundärmetaboliten. Die sehr gute Umsatzrate ist ein Hinweis darauf, dass die 5-Guanidino-2-oxo-pentansäure das natürliche Substrat von MrsA ist.

4.5. Rolle der von *P. syringae* pv. *syringae* 22d/93 produzierten Toxine *in planta*

Um die Bedeutung der von Pss22d produzierten Toxine in der Antibiose gegen das Pathogen Psg *in vitro* sowie *in planta* zu analysieren, wurden die Syringomycin/Syringopetin-negative Doppelmutante Pss22d.ΔsypA/syrE und die MeArg-negative Mutante Pss22d.1 untersucht (Manuskript III). Die von *P. syringae* pv. *syringae* produzierten Lipodepsipeptide Syringopeptin und Syringomycin werden über nicht-

ribosomale Peptidsynthese (NRPS) synthetisiert (Bender *et al.*, 1999). Um die Biosynthese beider Toxine zu unterbinden, wurden die essentiellen Gene *sypA* (Syringopeptin) und *syrE* (Syringomycin) deletiert. Der Nachweis aller Toxine erfolgte im Agardiffusionstest, wobei *Geotrichum candidum* (Syringomycin), *Bacillus megaterium* (Syringopeptin) und Psg (MeArg) als Indikatorstämme eingesetzt wurden. Mit Hilfe der Doppelmutante Pss22d.ΔsypA/syrE konnte nachgewiesen werden, dass nur MeArg für die *in vitro* Antibiose gegen Psg verantwortlich ist (Manuskript III). Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da bekannt ist, dass sowohl Syringopeptin als auch Syringomycin nur in geringem Umfang auf Gram-negative Bakterien wirken (Fogliano *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte so gezeigt werden, dass weder die Mutation des Genes *sypA* noch die Mutation des Genes *syrE* die Biosynthese von MeArg beeinflussen.

Der Vergleich aller Mutanten in den *in planta* Koinokulationsversuchen mit dem Wildtyp Pss22d ergab keine signifikanten Unterschiede in der Hemmung des Pathogenwachstums auf der Sojabohne. Dieses Ergebnis überraschte, da das aufgereinigte und auf die Pflanze aufgebrachte MeArg in der höchsten Konzentration (300 ng/Wunde) eine signifikante Unterdrückung des Pathogens Psg bewirkte (Manuskript III). Die erste Vermutung, dass MeArg von Pss22d auf der Pflanze nicht produziert wird, wurde durch *in situ* Nachweise widerlegt. Diese sich widersprechenden Resultate zeigen, dass *in planta* Versuche stark von den im Labor durchgeführten Versuchen abweichen können (Rodriguez & Pfender, 1997). So wurde schon früher vermutet, dass auf der Blattoberfläche befindliche Stoffe Antibiotika binden und neutralisieren können (Edwards & Seddon, 2001).

In der Natur werden antibiotische Substanzen in der Regel nur in geringen Mengen produziert (Wellington *et al.*, 1993). Da solche Sekundärmetabolite auch zeitlich und räumlich unterschiedlich gebildet werden, ist es schwer, Wirkstoffe *in situ* nachzuweisen und ihre Bedeutung z. B. für die Biokontrolle zu evaluieren (Thomashow *et al.*, 1997; Raaijmakers *et al.*, 1999). Ein gut untersuchtes Beispiel ist der im Boden vorkommende BKO *P. fluorescens*, der den Wirkstoff 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) produziert (Raaijmakers & Weller, 1998). Bei diesem Gram-negativen Bakterium, das vor allem die Welkekrankheit von Getreide effektiv vermindert, wurde beobachtet, dass es sowohl *in vitro* als auch *in planta* eine positive Korrelation zwischen der Populationsdichte und der DAPG-Produktion gibt (Raaijmakers *et al.*, 1999). Jedoch führte eine erhöhte Populationsdichte und eine signifikante Steigerung der DAPG-Produktion *in planta* nicht zur verbesserten Kontrolle des Welkeerregers *Gaeumannomyces graminis*. Diese konträre

Beobachtung wurde mit der räumlich und zeitlich veränderten Produktion des Toxins DAPG im Boden erklärt. Die von Raaijmakers und Weller (1998) gemachte Beobachtung kann auf viele in der Natur produzierte antibiotische Stoffe übertragen werden. Auch in dieser Arbeit wurde eine *in situ* Produktion von MeArg auf der Sojabohne nachgewiesen. Es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob die Produktion in ausreichender Konzentration an den Orten mit Pathogenbesiedlung stattfand. Diese Frage wäre lösbar durch fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen mit Hilfe eines fluoreszierenden Reportergens (GFP) (Lindow, 1995; Weingart *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2007), welches mit der Promotorregion des Operons *mrsA/B* verlinkt ist und in Pss22d exprimiert wird. Somit lässt sich die Promotoraktivität des Biosynthesegenclusters von MeArg auf der Blattoberfläche beobachten. Zwar können dadurch keine quantitativen Daten erhoben werden, doch wird zusätzlich das Pathogen Psg über ein konstitutiv exprimiertes Reportergen (DSred) mikroskopisch sichtbar gemacht, könnten erstmals Rückschlüsse auf die Verteilung der MeArg-Produktion in Beziehung zum Pathogen in natürlicher Umgebung gezogen werden.

Auch die in den Pflanzenversuchen angewandten Inokulationsmethoden könnten die Ergebnisse stark beeinflussen, da die Startbedingungen der inokulierten Bakterien bei den angewandten Methoden (Sprühen, Injizieren, Tauchen, etc.) sehr variieren können (Koch *et al.*, 1991; Akhtar *et al.*, 2008; Ruz *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit angewendete „pinprick“-Technik, die den inokulierten Stämmen Pss22d und Psg erlaubt, durch künstlich erzeugte Wunden den Wirt zu besiedeln, ist ein weit verbreitetes Inokulationsprinzip (May *et al.*, 1997; Scholz-Schroeder *et al.*, 2001a). Bei dieser Methode ist es möglich, die Pflanzenoberfläche mit definierten Bakteriendichten zu beimpfen und dadurch vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen. Ein weiterer Vorteil liegt in der Bonitierung der infizierten Wunden. Durch die Entnahme definierter Flächen um die künstlichen Wunden können vergleichende Studien zwischen Koinokulationsversuchen und Einzelinokulationen durchgeführt werden. Ein Nachteil der „pinprick“-Technik ist, dass der BKO und das Pathogen nicht, wie in der Natur üblich, eine epiphytische Phase durchleben und sich erst auf der Blattoberfläche etablieren müssen. Naturnahe Bedingungen werden dagegen durch eine Sprühinokulation der Pflanzen erreicht. Jedoch ist es bei diesem Versuchsdesign unmöglich, exakte Aussagen über die Ausgangsdichten der Bakterien auf der Pflanzenoberfläche zu treffen. Weiterhin ist die Erfassung der Populationsentwicklung in den infizierten Pflanzen sehr schwierig, wenn vergleichende Studien zwischen Einzel- und Koinokulationen durchgeführt werden sollen. Größter

Vorteil dieses Versuchsdesigns ist eine weitgehend natürliche Besiedlung der Pflanzenoberfläche durch das Pathogen und den BKO, wodurch im Vergleich mit der „pinprick“-Technik unterschiedliche Ergebnisse gewonnen werden könnten. Aus vorangegangenen Studien hinsichtlich des in dieser Arbeit verwendeten Modellsystems ist jedoch bekannt, dass die antagonistische Wirkung von Pss22d auf Psg nach Sprühinokulation unter Feldbedingungen ebenso effektiv war wie bei der „pinprick“-Technik (May *et al.*, 1997). Aufgrund dessen wird angenommen, dass die hier mittels „pinprick“-Technik ermittelten Resultate auch bei einer natürlichen Infektion Gültigkeit haben.

Aufgrund der Ergebnisse der *in planta* Versuche mit verschiedenen Toxin-negativen Mutanten ist davon auszugehen, dass die von Pss22d produzierten Toxine Syringomycin, Syringopeptin und auch das *in vitro* auf Psg wirkende 3-Methylarginin (MeArg) in dem hier vorgestellten Biokontrollmodell eine untergeordnete Rolle spielen. Obwohl alle *in vitro* durchgeführten Versuche mit Pss22d darauf hindeuteten, dass MeArg ein entscheidender Faktor für den Antagonismus von Pss22d gegen das Pathogen Psg darstellte, konnte diese Hypothese *in planta* nicht bestätigt werden. Die in dieser Studie durchgeführten *in planta* Versuche mit der MeArg-negativen Mutante Pss22d.1 zeigten deutlich, dass die antagonistische Wirkung sich nicht signifikant von der des Wildtyps Pss22d unterschied. Ein etwas anderes Ergebnis zeigte sich bei Zugabe von aufgereinigtem MeArg, welches direkt auf die mit Psg infizierten, künstlichen Wunden appliziert wurde. In der höchsten getesteten Konzentration von 300 ng/Wunde MeArg war über einen Zeitraum von 21 Tagen ein signifikanter Unterschied der Populationsdichte von Psg im Vergleich zur Kontrollpopulation (Wasserapplikation) zu beobachten. Allerdings war diese Verringerung der Populationsdichte noch nicht ausreichend, um den Schwellenwert, an dem deutliche Symptome des Bakterienbrandes auftreten, zu unterschreiten. Es ist offenbar eine hohe Konzentration an MeArg notwendig, um den Erreger Psg *in planta* effizient zu unterdrücken. *In situ* konnten jedoch nur geringere Mengen MeArg (ca. 300 ng/g Frischgewicht) nachgewiesen werden

Da auch die von Pss22d produzierten Lipodepsipeptide Syringomycin und Syringopeptin sowohl *in vitro* als auch *in planta* keine Rolle im Antagonismus zwischen Pss22d und Psg spielten, müssen andere Faktoren von entscheidender Rolle sein. Im Zusammenhang mit der Biologischen Kontrolle wurden sehr oft die von Bakterien gebildeten Siderophore diskutiert (Haas & Defago, 2005). Diese niedermolekularen Substanzen werden von der Bakterienzelle in die Umgebung abgegeben, um das wichtige

Spurenelement Eisen zu binden und für die Bakterienzelle bioverfügbar zu machen. Eisenionen sind ein wichtiger Bestandteil (Cofaktor) vieler Enzyme des Primärstoffwechsels und somit essentiell für das mikrobielle Wachstum. BKO, die Siderophore mit hoher Affinität zu Eisenionen bilden, könnten potentielle Erreger durch Konkurrenz um Eisen ausschalten. Solch ein Spezialfall der Nahrungskonkurrenz wurde auch in dem hier beschriebenen dreigliedrigen Modellsystem vermutet. Doch *in planta* Untersuchungen an Pss22d-Siderophor-negativen Mutanten ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Biologischen Kontrolle des Erregers Psg im Vergleich zum Wildtyp Pss22d (Wensing, 2006).

Eine weitere, in der Biologischen Kontrolle vertretene Hypothese ist das Konkurrenzausschlussprinzip (Bull *et al.*, 1998; Stockwell *et al.*, 2002). Demnach besetzen konkurrierende Bakterien ökologische Nischen, die sich in Nahrungsangebot und abiotischen Faktoren sehr stark ähneln. In dem hier beschriebenen Modell ist Pss22d vermutlich ein starker Konkurrent gegenüber dem Pathogen Psg. Für diese Konkurrenzhypothese spricht, dass während der *in planta* Koinokulationsversuche der Erreger Psg innerhalb der ersten 12 Stunden auf ein Überlebensminimum (10^1 cfu/Wunde) reduziert wurde. In diesen ersten 12 Stunden befanden sich beide koinokulierten Pseudomonaden in der durch die künstlichen Wunden stark verkürzten epiphytischen Wachstumsphase. In dieser kritischen Phase war der sehr gut angepasste und schnell wachsende Epiphyt Pss22d vermutlich im Vorteil und verdrängte Psg räumlich, bevor dieser in den Interzellularraum immigrieren konnte. Der in den Koinokulationsversuchen, im Vergleich zur Einzelinokulation, beobachtete Anstieg der Pss22d-Populationsdichte um das 10fache könnte durch ein im späteren Verlauf der Koexistenz beider Pseudomonaden parasitisches Verhalten von Pss22d erklärt werden. Pss22d nutzte die von dem Pathogen, aufgeschlossenen Nahrungsquellen mit und verringerte so dessen Nahrungsgrundlage. Durch den potentiellen BKO Pss22d wurde so ein Mangel an Nahrung und Raum erzeugt, so dass Psg den kritischen Schwellenwert zur Ausprägung von Symptomen des Bakterienbrandes nicht erreichen konnte.

5. Ausblick

Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse verdeutlichen, dass die von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 (Pss22d) gebildeten Toxine Syringomycin, Syringopeptin und 3-Methylarginin (MeArg) in dem hier untersuchten Modellsystem der Biologischen Kontrolle eine untergeordnete Rolle spielen. Es konnte somit die anfangs gestellte Frage, nach dem zugrunde liegenden Wirkmechanismus der Biologischen Kontrolle durch Pss22d, nicht hinreichend beantwortet werden. Um dieser Frage nachzugehen sind neue Mutationsversuche empfehlenswert, in denen neben der Toxin- auch die Siderophorproduktion in Pss22d ausgeschaltet wird. Eine solche Mutante ist eventuell nicht mehr in der Lage, in Konkurrenz gegenüber dem Pathogen Psg zu treten. Auch die *in situ* Beobachtung beider Kontrahenten auf der Blattoberfläche und in den Interzellularräumen mittels Fluoreszenzmikroskopie könnte Aufschluss über die Populationsdynamik und die Lokalisierung von Pss22d zu Psg geben. Falls, wie vermutet, beide Kontrahenten räumlich kaum getrennt leben, könnte auch die bakterielle Kommunikation von Bedeutung sein. Das als Quorum sensing bezeichnete Kommunikationssystem arbeitet über kleine extrazelluläre Signalmoleküle (*N*-Acyl-homoserin-lactone, AHLs), die unter anderem die Populationsdichte, aber auch die Produktion verschiedener Sekundärmetabolite beeinflussen. Da beide in dieser Arbeit untersuchten Stämme zu der Art *Pseudomonas syringae* gehören, ist durchaus auch eine Interferenz der Quorum-sensing-Systeme beider Kontrahenten denkbar. Genauere Untersuchungen der von Pss22d und Psg produzierten AHLs könnten Aufschluss über einen solchen möglichen Effekt geben. Sich daran anschließende Mutationen des Quorum-sensing-Systems bei Pss22d und die Untersuchungen dieser Mutanten *in planta*, würde die Bedeutung der produzierten AHLs bei der Interaktion im dreigliedrigen System Antagonist- Pathogen-Pflanze aufzeigen.

Des Weiteren sollte auf diesen Ergebnissen aufbauend die spezielle Hemmung des Pathogens Psg durch MeArg untersucht werden. Hinweise auf die Wirkung geben neben der Struktur von MeArg auch die Aufhebung der toxischen Wirkung durch die Aminosäure L-Arginin. Durch Aktivitätsassays mit abgeleiteten Zielenzymen, wie Argininosuccinase oder Stickstoffmonoxid-Synthase, wäre es möglich Hinweise über den genauen Wirkungsort von MeArg zu erhalten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Unterdrückung der Populationsentwicklung des Pathogens Psg *in planta* vermutlich nicht auf Antibiose, sondern auf Konkurrenz der beiden Interaktionspartner um das Habitat und dessen Nährstoffe beruht. Deshalb könnte der bakterielle Epiphyt Pss22d durchaus als

Biokontrollorganismus auch für andere Pathosysteme von Bedeutung sein. Andererseits ist das vom Pss22d gebildete MeArg ein hochselektiver Wirkstoff gegen den Erreger des Bakterienbrandes, so dass auch ein gezielter Einsatz in der Agrarwirtschaft denkbar wäre.

6. Zusammenfassung

Das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 wurde 1993 von einem symptomfreien Blatt der Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.) isoliert und zeigte sowohl *in vitro* als auch *in planta* hervorragende antagonistische Eigenschaften gegenüber dem Erreger des Bakterienbrandes der Sojabohne *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Um die Mechanismen, die für diesen Antagonismus verantwortlich sind, zu charakterisieren, wurden die von Pss22d produzierten Antibiotika Syringopeptin, Syringomycin und die seltene Aminosäure 3-Methylarginin (MeArg) untersucht. Durch eine Syringomycin/Syringopeptin-Doppelmutante konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die selektive *in vitro* Hemmung des Pathogens Psg allein auf der Wirkung des Antibiotikums MeArg beruht. Die *in vitro* Hemmung konnte durch die Aminosäure L-Arginin aufgehoben werden, was darauf hinweist, dass MeArg direkt in die Biosynthese von Arginin oder einen Arginin-abhängigen Stoffwechselweg (z. B. Stickstoffmonoxid-Synthese) eingreift.

Das stark polare MeArg wurde über Ionenaustauschchromatographie und RP-HPLC aufgereinigt, wobei der Agardiffusionstest mit dem Indikatorstamm Psg zur Identifizierung antibiotisch aktiver Fraktionen diente. Die Analyse der Struktur von MeArg erfolgte über HR-ESI-MS/MS und NMR-Spektroskopie. MeArg wurde als seltene Aminosäure identifiziert, die sich nur durch eine Methylierung am dritten Kohlenstoff von Arginin unterscheidet und die antibiotischen Eigenschaften gegenüber dem nah verwandten Stamm Psg bedingt. Die natürlich vorkommende Aminosäure MeArg wurde bisher nur als Bestandteil des Lavendomycins aus dem Gram-positiven Bakterium *Streptomyces lavendulae* subsp. *brasilicus* beschrieben. Durch Markierungsversuche mit Deuterium-markiertem Methionin konnte nachgewiesen werden, dass der Hauptschritt der Synthese, der Einbau der Methylgruppe in MeArg, durch eine S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methyltransferase vermittelt wird.

Durch Transposon-Mutagenese des Stammes Pss22d wurden vier MeArg-negative Mutanten erzeugt, wobei nur die Mutante Pss22d.1 die Lipodepsipeptide Syringopeptin und Syringomycin analog zum Wildtyp Pss22d produzierte. Durch Sequenzierung wurde die Integrationsstelle des Transposons analysiert und ein Gen für eine SAM-abhängige Methyltransferase identifiziert. Mittels *in silico* Analysen der Nachbarregion zur Methyltransferase im nah verwandten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (PssB728a) wurden zwei weitere Gene, die für eine Aminotransferase und einen Aminosäure-Exporter kodieren, identifiziert. Ausgehend von den bekannten

Sequenzinformationen des Stammes PssB728a wurden Primer für die Amplifikation des MeArg-Biosynthesegenclusters in Pss22d abgeleitet. Das erhaltene 3.150 bp große Fragment wurde kloniert und anschließend vollständig sequenziert. Das Fragment enthielt drei Gene *mrsA/B/C*, die für eine SAM-abhängige Methyltransferase MrsA, eine Aminotransferase MrsB und einen Aminosäure-Exporter MrsC kodieren. Die Übertragung des Genclusters aus Pss22d in *E. coli* führte zu einer heterologen Produktion von MeArg. Komplementation der MeArg-negativen Mutante Pss22d.1 mit dem Gencluster stellte die Produktion von MeArg wieder her.

Darüber hinaus wurde das Schlüsselenzym der MeArg-Biosynthese, die Methyltransferase MrsA, in *E. coli* heterolog als His-tag markiertes Protein, überexprimiert und funktional analysiert. MrsA katalysiert die Übertragung der Methylgruppe von *S*-Adenosylmethionin auf das Substrat 5-Guanidino-2-oxo-pentansäure zu 5-Guanidino-3-methyl-2-oxo-pentansäure. Diese Reaktion war hochselektiv, da mögliche Substrate, wie Pyruvat, α -Ketoglutarat, Phenylpyruvat, nicht umgesetzt wurden. Die Analysen weiterer, in der Produktion von MeArg veränderten, Tn5-Mutanten ergaben, dass die MeArg-Bildung durch GacS/GacA und PhoP/PhoQ reguliert wird.

Um die Bedeutung der von Pss22d produzierten Toxine für den Antagonismus *in planta* zu prüfen, wurde das Pathogen Psg entweder mit dem Wildtyp Pss22d, der Syringomycin/Syringopeptin-Doppelmutante Pss22d. Δ sypA/syrE oder der MeArg-negativen Mutante Pss22d.1 auf künstliche Wunden an Sojablättern koinokuliert. In allen drei Fällen wurde der Erreger des Bakterienbrands effizient unterdrückt. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass keines der von Pss22d produzierten Toxine einen entscheidenden Einfluss auf den Antagonismus hat. Folglich müssen andere Faktoren in der *in planta* Wechselwirkung zwischen Pss22d und Psg wirken, die diesen effizienten Antagonismus bedingen. Wahrscheinlich ist die Konkurrenz um Nährstoffe und Raum ein entscheidender Faktor der effizienten Biokontrolle durch Pss22d. Dafür spricht die starke Verringerung der Populationsdichte des Pathogens Psg um zwei Zehnerpotenzen in den ersten 12 Stunden nach Inokulation der Sojablätter. In dieser Startphase musste sich, im Gegensatz zu dem hervorragend an die epiphytische Lebensweise angepassten Pss22d, das Pathogen erst im Habitat etablieren. Die Steigerung der Populationsdichte des Antagonisten Pss22d um eine Zehnerpotenz und die Reduktion der Pathogen-Zelldichte um zwei Zehnerpotenzen lässt vermuten, dass Pss22d von den durch das Pathogen freigesetzten Nährstoffen profitiert. Durch den Mangel an Nährstoffen und Raum kann der Erreger Psg den kritischen Schwellenwert zum Ausbilden von Krankheitssymptomen nicht erreichen.

7. Summary

The Gram-negative bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93, isolated from symptom free soybean leaves (*Glycine max* (L.) Merr.), had been characterized as a promising and species-specific biocontrol strain *in vitro* and *in planta* against the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Psg), which causes bacterial blight of soybean. To evaluate the active principles in this biocontrol model system, the toxins produced by Pss22d were analyzed in detail. Three antibiotics are known to be produced by Pss22d: syringomycin, syringopeptin, and the rare amino acid 3-methylarginine (MeArg). In contrast to syringopeptin and syringomycin, only MeArg inhibited the growth of Psg highly selectively *in vitro*. The inhibition can be overcome by supplementing the growth medium with the essential amino acid L-arginine. This suggested that MeArg acts as an inhibitor of arginine biosynthesis or on an arginine-dependent pathway such as nitric oxide formation. The highly polar MeArg was purified by bioassay-guided fractionation using ion-exchange chromatography and subsequent RP-HPLC fractionation. The structure of MeArg was identified by HR-ESI-MS/MS, and NMR spectroscopy experiments. MeArg, similar to the essential amino acid L-arginine, carries a methylation on the third carbon, which results in antibiotic activity. This rare amino acid has previously only been known as a constituent of the antibiotic lavendomycin from *Streptomyces lavendulae* subsp. *brasiliensis*. Feeding labeled methionine to Pss22d indicated that the key step in the biosynthesis of MeArg is the introduction of the methyl group by an *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferase.

Transposon mutagenesis of Pss22d revealed four MeArg-negative mutants, but only one (Pss22d.1) produced the lipodepsipeptides syringopeptin and syringomycin like the wild type Pss22d. Analysis of the location of transposon insertion within the genome of Pss22d.1 identified a gene with high similarity to a SAM-dependent methyltransferase. *In silico* analyses of the neighboring region in the fully sequenced and closely related strain *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (PssB728a) identified two genes coding for an aminotransferase and an amino acid exporter. Based on the sequence of PssB728a, primers were designed to amplify the putative MeArg biosynthesis cluster of Pss22d. The obtained 3,150 bp fragment was cloned and fully sequenced. The MeArg gene cluster consists of a SAM-dependent methyltransferase gene, *mrsA*, the aminotransferase coding gene, *mrsB*, and a gene for an amino acid exporter, *mrsC*. Transfer of the entire gene cluster into *E. coli* resulted in the heterologous production of MeArg. Complementation of the Tn5-mutant Pss22d.1 with the plasmid pB3150 harboring the gene cluster restored MeArg production.

The key enzyme for MeArg formation was heterologously expressed in *E. coli* as His-tagged protein, purified and functionally characterized. The methyltransferase MrsA transfers the methyl group from SAM to 5-guanidino-2-oxo-pentanoic acid to yield 5-guanidino-3-methyl-2-oxo-pentanoic acid. MrsA rapidly and selectively introduces the methyl-group. Other substrates such as pyruvate, α -keto-glutarate, or phenylpyruvate were not methylated by MrsA. Analysis of Tn5-mutants suggested that MeArg production is controlled by the GacS/GacA and PhoP/PhoQ regulators.

To examine whether the antibiotic compounds produced by Pss22d are responsible for the observed antagonistic effects *in planta*, the pathogen Psg was coinoculated with either Pss22d wild-type, the syringopeptin/syngomycin-negative double mutant (Pss22d. Δ sypA/syrE), or the MeArg-negative mutant (Pss22d.1) into wounds of pin-pricked leaves of greenhouse soybean plants. In all three cases, the wild-type Pss22d and its toxin-deficient mutants prevented development of disease symptoms normally caused by Psg. These results indicated that neither syringopeptin, nor syngomycin, nor 3-methylarginine was required for Pss22d's antagonistic activity *in planta*. Consequently, factors other than the three toxins may contribute to the intra-species antagonism *in planta*. Mechanisms such as nutrient competition or blocking entry sites may play a more important role for the antagonism studied here. Support for the competition hypothesis in our study was provided by the observation that the pathogen's cell numbers dramatically declined (10^3 - 10^1 cfu/wound) during the first 12 h of co-inoculation with the antagonist. At this stage both organisms live epiphytically on the plant surface and Pss22d may use up available nutrients, thus temporarily outcompeting the pathogen. At a later stage the population of Pss22d grows 10-fold higher in the presence of Psg because Pss22d benefits from nutrients released from the plant cells' cytoplasm that Psg makes available. Starvation caused by Pss22d may keep the pathogen's population below the threshold at which disease symptoms develop.

8. Literatur

- Agrios GN.** (2005) Plant Pathology. 5th, Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA; San Diego, California, USA; London, UK.
- Akhtar MA, Rafi A, Hameed A.** (2008) Comparison of methods of inoculation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice cultivars. *Pakistan Journal of Botany* **40**:2171-2175.
- Aleshin VV, Zakataeva NP, Livshits VA.** (1999) A new family of amino-acid-efflux proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **24**:133-135.
- Angioni A, Del Real AA, Russo M, Melis M, Cabitza F, Cabras P.** (2003) Triazole fungicide degradation in peaches in the field and in model systems. *Food Additives and Contaminants* **20**:368-374.
- Arrebola E, Cazorla FM, Duran VE, Rivera E, Olea F, Codina JC, Perez-Garcia A, de Vicente A.** (2003) Mangotoxin: a novel antimetabolite toxin produced by *Pseudomonas syringae* inhibiting ornithine/arginine biosynthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**:117-127.
- Arrebola E, Cazorla FM, Romero D, Perez-Garcia A, de Vicente A.** (2007) A nonribosomal peptide synthetase gene (mgoA) of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is involved in mangotoxin biosynthesis and is required for full virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**:500-509.
- Bachmann AS, Patil SS.** (2003) Characterization of ornithine decarboxylase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and its inhibition by phaseolotoxin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**:57-63.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, DineshKumar SP.** (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* **276**:726-733.
- Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC.** (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**:266-292.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L.** (2003) Biochemie. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany.
- Blinkova A, Burkart MF, Owens TD, Walker JR.** (1997) Conservation of the *Escherichia coli* dnaX programmed ribosomal frameshift signal in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **179**:4438-4442.
- Braun-Kiewnick A, Jacobsen BJ, Sands DC.** (2000) Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology* **90**:368-375.
- Bull CT, Stack JP, Smilanick JL.** (1997) *Pseudomonas syringae* strains ESC-10 and ESC-11 survive in wounds on citrus and control green and blue molds of citrus. *Biological Control* **8**:81-88.
- Bull CT, Wadsworth ML, Sorensen KN, Takemoto JY, Austin RK, Smilanick JL.** (1998) Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. *Biological Control* **12**:89-95.
- Burrill TJ.** (1878) Bacterial blight. *Trans III State Hort Soc* **11**:79-80.

- Busenlehner LS, Pennella MA, Giedroc DP.** (2003) The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **27**:131-143.
- Buysens S, Huengens K, Poppe J, Hofte M.** (1996) Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:865-871.
- Chen X, Wood AJ.** (2004) Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine nicotinic acid-N-methyltransferase from leaves of *Glycine max*. *Biologia Plantarum* **48**:531-535.
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, van der Bij AJ, van der Drift KMGF, Schripsema J, Kroon B, Scheffer RJ, Keel C, Bakker PAHM, Tichy HV, de Bruijn FJ, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ.** (1998) Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**:1069-1077.
- Coerper FM.** (1919) Bacterial blight of soybean. *Journal of Agriculture Research* **18**:179-193.
- Cronin D, MoenneLoccoz T, Fenton A, Dunne C, Dowling DN, OGara F.** (1997a) Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiology Ecology* **23**:95-106.
- Cronin D, MoenneLoccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN, OGara F.** (1997b) Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:1357-1361.
- Cui J, Bahrami AK, Pringle EG, Hernandez-Guzman G, Bender CL, Pierce NE, Ausubel FM.** (2005) *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:1791-1796.
- Dong YH, Zhang XF, Xu JL, Zhang LH.** (2004) Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:954-960.
- Doudorof M, Palleroni NJ.** (1974) Genus I. *Pseudomonas* Migula. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. (pp. 217-243), Williams & Wilkins, Baltimore.
- Duffy B, Schouten A, Raaijmakers JM.** (2003) Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* **41**:501-538.
- Duffy BK, Defago G.** (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:2429-2438.
- Eastgate JA.** (2008) *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fireblight disease. *Molecular Plant Pathology* **1**:325-329.
- Edwards SG, Seddon B.** (2001) Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *Journal of Applied Microbiology* **91**:652-659.

- Eicken C, Pennella MA, Chen X, Koshlap KM, VanZile ML, Sacchettini JC, Giedroc DP.** (2003) A metal-ligand-mediated intersubunit allosteric switch in related SmtB/ArsR zinc sensor proteins. *Journal of Molecular Biology* **333**:683-695.
- Elliott CE, Gardiner DM, Thomas G, Cozijnsen A, De Wouw AV, Howlett BJ.** (2007) Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. *Molecular Plant Pathology* **8**:791-802.
- Emmert EAB, Handelsman J.** (1999) Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* **171**:1-9.
- Feil H, Feil WS, Chain P, Larimer F, DiBartolo G, Copeland A, Lykidis A, Trong S, Nolan M, Goltsman E, Thiel J, Malfatti S, Loper JE, Lapidus A, Detter JC, Land M, Richardson PM, Kyrpides NC, Ivanova N, Lindow SE.** (2005) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:11064-11069.
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M, O'Gara F.** (1992) Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:3873-3878.
- Fishlock D, Perdicakis B, Montgomery HJ, Guillemette JG, Jervis E, Lajoie GA.** (2003) Synthesis and evaluation of trans 3,4-cyclopropyl L-arginine analogues as isoform selective inhibitors of nitric oxide synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **11**:869-873.
- Fogliano V, Ballio A, Gallo M, Woo S, Scala F, Lorito M.** (2002) *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**:323-333.
- Fontan PA, Walters S, Smith I.** (2004) Cellular signaling pathways and transcriptional regulation in *Mycobacterium tuberculosis*: Stress control and virulence. *Current science* **86**:122-134.
- Fravel DR.** (1988) Role of antibiosis in the biocontrol of plant-diseases. *Annual Review of Phytopathology* **26**:75-91.
- Gaffney TD, Lam ST, Ligon J, Gates K, Frazelle A, Dimaio J, Hill S, Goodwin S, Torkewitz N, Allshouse AM, Kempf HJ, Becker JO.** (1994) Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological-control strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**:455-463.
- Genka H, Baba T, Tsuda M, Kanaya S, Mori H, Yoshida T, Noguchi MT, Tsuchiya K, Sawada H.** (2006) Comparative analysis of argK-tox clusters and their flanking regions in phaseolotoxin-producing *Pseudomonas syringae* pathovars. *Journal of Molecular Evolution* **63**:401-414.
- Georgakopoulos DG, Henderson M, Panopoulos NJ, Schroth MN.** (1994) Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation reporter gene. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:2931-2938.
- Gesteland RF, Atkins JF.** (1996) Recoding: Dynamic reprogramming of translation. *Annual Review of Biochemistry* **65**:741-768.

- Gottesman S.** (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **19**:565-587.
- Gottlieb D.** (1976) The production and role of antibiotics in soil. *The Journal of antibiotics* **29**:987-1000.
- Haas D, Blumer C, Keel C.** (2000) Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected: importance of positive feedback regulation. *Current Opinion in Biotechnology* **11**:290-297.
- Haas D, Defago G.** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* **3**:307-319.
- Hamdan H, Weller DM, Thomashow LS.** (1991) Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:3270-3277.
- Handelsman J, Stabb EV.** (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* **8**:1855-1869.
- Heeb S, Haas D.** (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**:1351-1363.
- Hernandez-Guzman G, Alvarez-Morales A.** (2001) Isolation and characterization of the gene coding for the amidinotransferase involved in the biosynthesis of phaseolotoxin in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**:545-554.
- Howell CR, Stipanovic RD.** (1979) Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* **69**:480-482.
- Hutcheson SW.** (2001) The molecular biology of hypersensitivity to plant pathogenic bacteria. *Journal of Plant Pathology* **83**:151-172.
- Ijuin R, Umezawa N, Nagai S, Higuchi T.** (2005) Evaluation of 3-substituted arginine analogs as selective inhibitors of human nitric oxide synthase isozymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**:2881-2885.
- Inoue K, Parvathi K, Dixon RA.** (2000) Substrate preferences of caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferases in developing stems of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **375**:175-182.
- Janisiewicz WJ, Korsten L.** (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* **40**:411-441.
- Jenal U, Hengge-Aronis R.** (2003) Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Current Opinion in Microbiology* **6**:163-172.
- Ji PS, Wilson M.** (2003) Enhancement of population size of a biological control agent and efficacy in control of bacterial speck of tomato through salicylate and ammonium sulfate amendments. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:1290-1294.
- Jin M, Liu L, Wright SAI, Beer SV, Clardy J.** (2003) Structural and functional analysis of pantocin A: An antibiotic from *Pantoea agglomerans* discovered by heterologous expression of cloned genes. *Angewandte Chemie-International Edition* **42**:2898-2901.

- Kang YW, Carlson R, Tharpe W, Schell MA.** (1998) Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:3939-3947.
- Keel C, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D, Defago G.** (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 - importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**:4-13.
- Keel C, Weller DM, Natsch A, Defago G, Cook RJ, Thomashow LS.** (1996) Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:552-563.
- Kers JA, Wach MJ, Krasnoff SB, Widom J, Cameron KD, Bukhalid RA, Gibson DM, Crane BR, Loria R.** (2004) Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* **429**:79-82.
- Kitten T, Kinscherf TG, McEvoy JL, Willis DK.** (1998) A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Microbiology* **28**:917-929.
- Klement Z.** (1963) Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic Pseudomonads. *Nature* **199**:299-300.
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN.** (1980) Enhanced plant-growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**:885-886.
- Koch M, Parlevliet JE, Mew TW.** (1991) Assessment of quantitative resistance of rice cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*: a comparison of inoculation methods. *Euphytica* **54**:169-175.
- Laville J, Voisard C, Keel C, Maurhofer M, Defago G, Haas D.** (1992) Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:1562-1566.
- Ligon JM, Hill DS, Hammer PE, Torkewitz NR, Hofmann D, Kempf HJ, van Pee KH.** (2000) Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science* **56**:688-695.
- Liljestrom P, Laamanen I, Palva ET.** (1988) Structure and expression of the *ompB* operon, the regulatory locus for the outer-membrane porin regulon in *Salmonella typhimurium* Lt-2. *Journal of Molecular Biology* **201**:663-673.
- Lindow SE.** (1995) The use of reporter genes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology* **4**:555-566.
- Llama-Palacios A, Lopez-Solanilla E, Poza-Carrion C, Garcia-Olmedo F, Rodriguez-Palenzuela P.** (2003) The *Erwinia chrysanthemi* *phoP-phoQ* operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. *Molecular Microbiology* **49**:347-357.
- Loper JE, Buyer JS.** (1991) Siderophores in microbial interactions on plant-surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**:5-13.

- Loughran ST, Loughran NB, Ryan BJ, D'Souza BN, Walls D.** (2006) Modified His-tag fusion vector for enhanced protein purification by immobilized metal affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* **355**:148-150.
- Lu SE, Wang N, Wang J, Chen ZJ, Gross DC.** (2005) Oligonucleotide microarray analysis of the *salA* regulon controlling phytotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**:324-333.
- Lugtenberg BJ, Chin AWTF, Bloemberg GV.** (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**:373-383.
- Mahlert C, Kopp F, Thirlway J, Micklefield J, Marahiel MA.** (2007) Stereospecific enzymatic transformation of alpha-ketoglutarate to (2S,3R)-3-methyl glutamate during acidic lipopeptide biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **129**:12011-12018.
- Maurhofer M, Keel C, Schnider U, Voisard C, Haas D, Defago G.** (1992) Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* Strain-CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology* **82**:190-195.
- May R, Völksch B, Kampmann G.** (1997) Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* *in vitro* and *in planta*. *Microbial Ecology* **34**:118-124.
- Mazzola M.** (2002) Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**:557-564.
- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL.** (2002) Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology* **40**:443-+.
- Miller SI, Mekalanos JJ.** (1990) Constitutive expression of the *phoP* regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *Journal of Bacteriology* **172**:2485-2490.
- Milne C, Powell A, Jim J, Al Nakeeb M, Smith CP, Micklefield J.** (2006) Biosynthesis of the (2S,3R)-3-methyl glutamate residue of nonribosomal lipopeptides. *Journal of the American Chemical Society* **128**:11250-11259.
- Milner JL, SiloSuh L, Lee JC, He HY, Clardy J, Handelsman J.** (1996) Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3061-3065.
- Mitchell R, Bielecki R.** (1977) Involvement of phaseolotoxin in halo blight of beans - transport and conversion to functional toxin. *Plant Physiology* **60**:723-729.
- Moncada S, Palmer RMJ.** (1991) Biosynthesis and actions of nitric-oxide. *Seminars in Perinatology* **15**:16-19.
- Montesinos E.** (2000) Pathogenic plant-microbe interactions. What we know and how we benefit. *International Microbiology* **3**:69-70.
- Montesinos E.** (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology* **6**:245-252.
- Montesinos E, Bonaterra A, Badosa E, Frances J, Alemany J, Llorente I, Moragrega C.** (2002) Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology* **5**:169-175.

- Mur LAJ, Carver TLW, Prats E.** (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* **57**:489-505.
- Nakayama T, Homma Y, Hashidoko Y, Mizutani J, Tahara S.** (1999) Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4334-4339.
- Nishida M, Matsubar.T, Watanabe N.** (1965) Pyrrolnitrin a new antifungal antibiotic - microbiological and toxicological observations. *Journal of Antibiotics* **18**:211-&.
- Normark S, Bergstrom S, Edlund T, Grundstrom T, Jaurin B, Lindberg FP, Olsson O.** (1983) Overlapping Genes. *Annual Review of Genetics* **17**:499-525.
- Oppenheim DS, Yanofsky C.** (1980) Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics* **95**:785-795.
- Ownley BH, Weller DM, Thomashow LS.** (1992) Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology* **82**:178-184.
- Pieterse CMJ, Van Pelt JA, Van Wees SCM, Ton J, Leon-Kloosterziel KM, Keurentjes JJB, Verhagen BWM, Knoester M, Van der Sluis I, Bakker PAHM, Van Loon LC.** (2001) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: Triggering, signalling and expression. *European Journal of Plant Pathology* **107**:51-61.
- Raaijmakers JM, Bonsall RE, Weller DM.** (1999) Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* **89**:470-475.
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, de Kock MJ.** (2006) Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**:699-710.
- Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT.** (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**:537-547.
- Raaijmakers JM, Weller DM.** (1998) Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol - Producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**:144-152.
- Rina M, Bouriatis V.** (1993) Cloning, purification and characterization of the BseCI DNA methyltransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Gene* **133**:91-94.
- Rodriguez F, Pfender WF.** (1997) Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 *in vitro* and *in planta*. *Phytopathology* **87**:614-621.
- Rogers YC, Munk AC, Meincke LJ, Han CS.** (2005) Closing bacterial genomic sequence gaps with adaptor-PCR. *BioTechniques* **39**:31-34.
- Ross AF.** (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**:340-358.
- Ruz L, Moragrega C, Montesinos E.** (2008) Evaluation of four whole-plant inoculation methods to analyze the pathogenicity of *Erwinia amylovora* under quarantine conditions. *International Microbiology* **11**:111-119.
- Sarniguet A, Kraus J, Henkels MD, Muehlchen AM, Loper JE.** (1995) The sigma factor sigma(S) affects antibiotic production and biological control activity of

- Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:12255-12259.
- Scholz-Schroeder BK, Hutchison ML, Grgurina I, Gross DC.** (2001a) The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of *sypA* and *syrB1* biosynthesis mutant analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**:336-348.
- Scholz-Schroeder BK, Soule JD, Lu SE, Grgurina I, Gross DC.** (2001b) A physical map of the syringomycin and syringopeptin gene clusters localized to an approximately 145-kb DNA region of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**:1426-1435.
- Shanahan P, Osullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, Ogara F.** (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent *Pseudomonad* and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:353-358.
- Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE, Rinehart KL, Farrand SK.** (1997) Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:6036-6041.
- Shoda M.** (2000) Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **89**:515-521.
- Sinclair CJ, Boxall ABA.** (2003) Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. *Environmental Science & Technology* **37**:4617-4625.
- Slininger PJ, Jackson MA.** (1992) Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**:388-392.
- Smirnova AV, Ullrich MS.** (2004) Topological and deletion analysis of CorS, a *Pseudomonas syringae* sensor kinase. *Microbiology* **150**:2715-2726.
- Smith MC, Furman TC, Ingolia TD, Pidgeon C.** (1988) Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. A new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *Journal of Biological Chemistry* **263**:7211-7215.
- Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF, Miller NE.** (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Research* **29**:1097-1106.
- Soncini F, Vescovi E, Solomon F, Groisman E.** (1996) Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: Identification of PhoP-regulated genes. *Journal of Bacteriology* **178**:5092-5099.
- Staskawicz BJ, Mudgett MB, Dangel JL, Galan JE.** (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* **292**:2285-2289.
- Stockwell VO, Johnson KB, Sugar D, Loper JE.** (2002) Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology* **92**:1202-1209.
- Stockwell VO, Stack JP.** (2007) Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology* **97**:244-249.

- Stromberg KD, Kinkel LL, Leonard KJ.** (2004) Quantifying the effect of bacterial antagonists on the relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and subsequent bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. *Biological Control* **29**:58-65.
- Teuber M.** (1999) Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**:755-763.
- Teuber M, Meile L, Schwarz F.** (1999) Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **76**:115-137.
- Thomas JG, Ayling A, Baneyx F.** (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli* - To fold or to refold. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **66**:197-238.
- Thomashow LS.** (1996) Biological control of plant root pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* **7**:343-347.
- Thomashow LS, Bonsall RF, Weller DM.** (1997) Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. In: Manual of Environmental Microbiology. (pp. 493-499), ASM Press, Washington, D.C.
- van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ.** (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**:453-483.
- Vincent MN, Harrison LA, Brackin JM, Kovacevich PA, Mukerji P, Weller DM, Pierson EA.** (1991) Genetic-analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:2928-2934.
- Völksch B, May R.** (2001) Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. *Microbial Ecology* **41**:132-139.
- Völksch B, Nüske J, May R.** (1996) Characterization of two epiphytic bacteria from soybean leaves with antagonistic activities against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of Basic Microbiology* **36**:453-462.
- Völksch B, Weingart H.** (1998) Toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae* and their antagonistic activities against epiphytic microorganisms. *Journal of Basic Microbiology* **38**:135-145.
- von Bodman S, Bauer W, Coplin D.** (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **41**:455-482.
- Wang JH, Pichersky E.** (1998) Characterization of S-adenosyl-L-methionine: (iso)eugenol O-methyltransferase involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **349**:153-160.
- Wang N, Lu SE, Wang J, Chen ZJ, Gross DC.** (2006) The expression of genes encoding lipodepsipeptide phytotoxins by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is coordinated in response to plant signal molecules. *Mol Plant Microbe Interact* **19**:257-269.
- Weingart H, Stubner S, Schenk A, Ullrich MS.** (2004) Impact of temperature on *in planta* expression of genes involved in synthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**:1095-1102.

- Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BBM, Thomashow LS.** (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **40**:309-348.
- Wellington E, Marsh P, Toth I, Cresswell N, Huddleston L.** (1993) The selective effects of antibiotics in soils. *Trends Microb Ecol* **1**:331-336.
- Wensing A.** (2006) Siderophore production of *Pseudomonas syringae* and its implication on the biological control of bacterial blight of soybean. *PhD Thesis, International University of Bremen*.
- Williams ST, Vickers JC.** (1986) The ecology of antibiotic production. *Microbial Ecology* **12**:43-52.
- Wilson CL.** (1997a) Biological control and plant diseases - a new paradigm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **19**:158-159.
- Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans ADL, Jefferson RA.** (1995) Beta-glucuronidase (Gus) transposons for ecological and genetic-studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **141**:1691-1705.
- Wilson M.** (1997b) Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **19**:188-191.
- Wood DW, Gong FC, Daykin MM, Williams P, Pierson LS.** (1997) N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Journal of Bacteriology* **179**:7663-7670.
- Wright SAI, Jin M, Clardy J, Beer SV.** (2006) The biosynthetic genes of pantocin A and pantocin B of *Pantoea agglomerans* Eh318. *Proceedings of the Xth International Workshop on Fire Blight*:313-319
- Yakhnin H, Babiarz JE, Yakhnin AV, Babitzke P.** (2001) Expression of the *Bacillus subtilis* trpEDCFBA operon is influenced by translational coupling and Rho termination factor. *Journal of Bacteriology* **183**:5918-5926.
- Young JM, Saddler G. S., Takikawa Y., DeBoer S.H., Vauterin L., Gardan L., Gvozdyak R. I., E. SD.** (1996) Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Review of Plant Pathology* **75**:721-763.
- Zou J, Rodriguez-Zas S, Aldea M, Li M, Zhu J, Gonzalez D, Vodkin L, DeLucia E, Clough S.** (2005) Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**:1161-1174.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie unter Anleitung von Prof. Dr. Erika Kothe angefertigt.

Mein herzlichster Dank gilt:

Dr. Beate Völksch für die Möglichkeit, in ihrem DFG-Projekt arbeiten zu dürfen, für ihr stets großes Interesse an meiner Arbeit, für viele unentbehrlichen Ratschläge und spannende Diskussionen und vor allem für ihre Geduld.

Prof. Dr. Erika Kothe dafür, dass ich am Lehrstuhl für Mikrobielle Phytopathologie arbeiten durfte, für viele anregende Diskussionen und Ratschläge und für die wissenschaftliche Motivation.

Dr. Dieter Spiteller für Aufreinigung und Analyse der Struktur von 3-Methylarginin, sowie der Synthese der Vorstufen. Außerdem hat er mir immer mit Rat und Tat beigestanden, wenn es um das Verfassen der Manuskripte ging. Mit seinen Tipps, Anregungen und Diskussionen zu dieser Arbeit hat er sowohl die Arbeit als auch mich immer vorangetrieben.

Prof. Dr. Matthias Ullrich für die Möglichkeit in seinen Laboren an der Jacobs Universität zu arbeiten und für die wertvollen Tipps und Anregungen zu meinem Thema. Für seine große Geduld und die unentbehrliche Hilfe beim Verfassen der Manuskripte.

Dr. Helge Weingart für die unentbehrlichen Tipps und Anregungen zu molekularbiologischen Arbeiten, die sehr guten Diskussion über dieses Thema und die Hilfe beim Verfassen der Manuskripte. Außerdem für die schöne Zeit in Bremen und die rundum sehr gute Betreuung, auch mit Kaffee, Kuchen und Bier.

Dr. Annette Wensing für die Einführung in die Welt der Molekularbiologie und Ihrer unendlichen Geduld mit mir. Mit ihrer Hilfe konnte ich plötzlich klonieren, DNA präparieren und viele andere molekular-biologische Dinge, die ich vorher als Ökologe nicht mal kannte.

Dr. Jörg Nüske für die wertvollen Tipps zu Ionenaustauschchromatographie und die Möglichkeit, die FPLC und HPLC zu nutzen.

Ulrike Sammer für die tollen Diskussionen und die sehr guten Tipps und Anregungen zu dieser Arbeit. Für eine tolle Zeit im Labor und für den vielen Kuchen, Tee und Kaffee.

Dr. Götz Haferburg für anspruchsvolle wie auch lustige Diskussionen nicht nur über meine Arbeit und für die netten Versuche mich seiner Musik und seinen Filmen näher zubringen.

Janine Hofmann für die tolle Zusammenarbeit im Labor und für die vorbildliche und fleißige Durchführung aller mikrobiologischen und chemischen Arbeiten zu ihrer Diplomarbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung des Forschungsprojektes. „Wirkmechanismen bei der Interaktion zwischen dem Antagonisten *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93, dem Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* und der Sojabohne“ (VO 558/6-3) und damit für die Finanzierung meiner Stelle.

Sämtlichen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima und für viele Hilfen und Anregungen.

Meinen Eltern und meinen Brüdern für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

Ganz besonders meiner Frau Christina, die mich in den letzten Jahren immer voll unterstützte und mich mit ihrer endlosen Geduld ertrug. Meiner Tochter Hannah für die tägliche Ablenkung und Freude.

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation “Die von *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 produzierten Toxine und ihr Einfluss auf die Biologische Kontrolle des Bakterienbrandes der Sojabohne” selbständig und nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst habe. Die Dissertation wurde in keiner anderen Fakultät oder Universität eingereicht.

.....

Ort, Datum

.....

Sascha Braun

Für Christina und Hannah